

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll)

Ein Vergleich der Wirkungen von Vinblastin und Vincristin
in vitro auf die Mitosen im menschlichen Knochenmark

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnärztin Barbara Dieckmann geborene Kaut
aus Neunkirchen/Saar

1977
—

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll)

Ein Vergleich der Wirkungen von Vinblastin und Vincristin
in vitro auf die Mitosen im menschlichen Knochenmark

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Barbara Dieckmann geborene Kaut
aus Neunkirchen/Saar

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. Hermann Michel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.10.1977

Onkel Richard und meinem Mann gewidmet





INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	7
III. Ergebnisse	18
IV. Diskussion	59
V. Zusammenfassung	67
VI. Literaturverzeichnis	69
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen von Vinblastin (Velbe) und Vincristin in vitro auf die Mitosen im menschlichen Knochenmark miteinander verglichen werden.

1. Historischer Überblick

Vinblastin (Velbe) und Vincristin sind aus den Blättern der Immergrünart *Vinca Rosea* Linn extrahierte Alkaloide. Sie werden als Cytostatica in die Therapie eingesetzt. HODES, ROHN, BOND (20) führten 1959 Velbe in die Humanmedizin als Chemotherapeutikum ein.

Eingeborene in Jamaika verwandten die Immergrünpflanze *Vinca rosea* seit langem zur Behandlung des Diabetes mellitus.

Zwei amerikanischen Forschergruppen, NOBLE, BEER und CUTTS (1, 31) an der University of Western Ontario in Kanada einerseits und JOHNSON, WRIGHT, SVOBODA und VLANTIS (22) in den Laboratorien der Firma Eli Lilly & Co in Indianapolis Indiana/USA andererseits gelang es im Tierversuch nicht, die antidiabetogene Wirkung nachzuweisen. Statt dessen stellten sie einen leukopenischen Effekt des Pflanzenstoffes fest. Anschließend Untersuchungen ergaben eine deutliche Beeinflussung experimenteller Leukämien und Tumoren.

2. Chemie

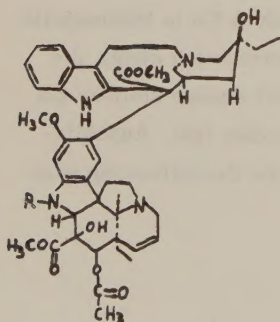
Als wirksame chemotherapeutische Komponenten der Immergrünpflanze wurden die Alkaloide Vincal leukoblastin oder auch Vinblastinsulfat (Abkürzung: VLB) und Leurocristin bzw. Vin-

cristin oder Vincristinsulfat (Abkürzung: LCR und VCR) isoliert.

Velbe und Vincristin sind die Warenbezeichnungen der Arzneimittelfirma Eli Lilly & Co in Indianapolis Indiana/USA. Bei den beiden einander isomeren Substanzen Velbe und Vincristin handelt es sich um zwei dimere Alkaloide, die sowohl Indol als auch Dihydroindol enthalten.

Die chemischen und physikalischen Untersuchungen von NEUSS, GORMAN, SVOBODA und MACIAK (19, 29, 30) erbrachten die Summenformeln für Velbe $C_{46}H_{58}O_9N_4$ und Vincristin $C_{46}H_{54}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$. Die Struktur des Vincristins gleicht derjenigen des Velbe weitgehend. Die komplexen Moleküle sind identisch, abgesehen davon, daß das Vincristinsulfat anstelle einer N-Methylgruppe am Dihydroindol eine N-Formylgruppe enthält.

Strukturformel:



R = CHO bei Vincristin (VCR)

R = CH_3 bei Velbe (VLB)

3. Wirkungen und Nebenwirkungen von VLB und VCR bei der therapeutischen Anwendung

Die Anwendung von Velbe ist vor allem indiziert bei generalisierter Lymphogranulomatose (M. Hodgkin) und bei Choriocarcinom, wenn dieses gegen jede andere verfügbare Therapie resistent ist. Die Verwendung von Velbe zur Behandlung anderer Tumoren ist in Kombination oder als Erhaltungstherapie angezeigt.

Vincristin ist besonders geeignet zur Behandlung akuter Lymphoblasten-Leukämien im Kindesalter, bei Erwachsenen ist es auch angezeigt bei anderen akuten Leukämien, bei Lymphomen und metastasierenden Carcinomen in Polychemotherapie.

Die Nebenwirkungen bei der Anwendung von Velbe scheinen dosisabhängig zu sein. Folgende Nebenerscheinungen sind bekannt: Anorexie, Emesis, Diarrhöe, Nausea, Haarausfall, Depressionen, Parästhesie, Phlebitis, Verlust der tiefen Sehnenreflexe. Während der Therapie ist darauf zu achten, daß die Leukocytenzahl nie unter 4000/ μ l sinkt, da schwere Knochenmark-Insuffizienzen vermieden werden müssen.

Die Nebenwirkungen bei der Anwendung von Vincristin sind ähnlich wie bei Velbe und im allgemeinen dosisabhängig und reversibel. Am häufigsten wird Alopecie beobachtet und am unangenehmsten sind die neuromuskulären Störungen. Die leukopenischen Reaktionen sind weitaus geringer als bei Velbe und anderen onkolytisch wirksamen Substanzen, da die Einzeldosis wegen der neurotoxischen Störungen niedriger gewählt wird. Die Einzeldosis beträgt höchstens 2 mg und wird höchstens einmal pro Woche verabreicht, während von Velbe bis zu 10 mg pro Dosis angewandt werden.

4. Wirkungsmechanismus

Durch Zerstörung der Spindelfasern verhindern beide Vinca-Alkaloide den Ablauf der Mitose und werden wegen dieses stathmokinischen Effektes, der schon sehr kurz (ca. 2 Std.) nach Kontakt mit diesen Alkaloiden eintritt, auch als Mitosegifte bezeichnet (22, 33, 37).

Bei morphologischen Studien (36) stellt sich die charakteristische Störung im Mitoseablauf vom Typ der C-Mitosen (Colchicin-Mitosen) dar. Die Anordnung der Chromosomen in der frühen Metaphase ist unregelmäßig. Bei hohen Dosen treten unorientierte Mitosen mit im Cytoplasma verstreuten Chromosomen (exploded metaphases) und Chromosomenverklumpungen in der Zellmitte, manchmal auch Ball-Metaphasen auf. Bei niedriger Konzentration sind die gestörten Metaphasen noch orientiert, wie "Stern-Mitosen", Drei-Gruppen-Mitosen und Polchromosomen-Metaphasen. Die Prophase wird offenbar nicht beeinflusst. Endphasen treten nicht mehr auf.

Velbe und Vincristin sind also wie Colchicin Spindelgifte (18, 26). Im Gegensatz zu Colchicin konnte für Velbe allerdings nachgewiesen werden, daß die Spindelschädigung reversibel ist (26). Nach Untersuchungen über die Spindelschädigung durch Desaggregation durch Velbe und Vincristin (3, 9, 14, 23) kann angenommen werden, daß durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen oder chemische Bindungen der Vinca-Alkaloide mit den Mikrotubuli, der kleinsten Baueinheit der Spindelfasern, eine Änderung in der Konformation der Strukturproteine auftritt.

Nach GEBHART (16) und FUSENIG (15) tritt der cytostatische Effekt der Vinca-Alkaloide nur in der Metaphase auf. Nach GEORGE (18) ist die Zellmembran nur in der Metaphase für Vincristin permeabel.

MARMONT et al. (27) schlossen, daß die Vinca-Alkaloide nur auf proliferierende Zellen eine cytostatische Wirkung ausüben können. Sie fanden unter der Therapie mit Velbe bzw. Vincristin eine quantitative Korrelation zwischen dem Ausmaß der blockierten Mitosen und der Regression des Tumors.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der Empfindlichkeit von Lymphomzellen für Velbe und Vincristin in vivo und in vitro besteht (38).

Die onkolytische Wirkung der Vinca-Alkaloide ist durch das Absterben der proliferierenden, in der Mitose arretierten Zellen zu erklären. Unbekannt ist zur Zeit noch, ob die Vinca-Alkaloide selbst oder ihre Metabolite die Cytostase bewirken.

Die Abnahme der DNS-Synthese unter Einwirkung der Vinca-Alkaloide ist dadurch zu erklären, daß die im Cyclus befindlichen Zellen in der Mitose blockiert werden und nicht mehr in die S-Phase eintreten können (13, 17, 39, 40).

Die beobachteten Effekte auf den Energie- und Kohlehydrat-Stoffwechsel sind wahrscheinlich Sekundärwirkungen bei unphysiologisch hohen Konzentrationen (15, 21, 32).

Nach Untersuchungen von CARDINALI und MEHROTRA (10, 28) ist die Mitoseanhäufung durch Vincristin im Knochenmark des Syrien-Hamsters bei den Erythroblasten größer als bei den granulopoetischen Vorstufen. Velbe verhält sich nach diesen Untersuchungen am Syrien-Hamster umgekehrt.

Velbe und Vincristin kombiniert haben einen additiven antimittischen Effekt auf Mäuseknochenmark (11).

5. Fragestellung:

In dieser Arbeit soll versucht werden, folgende Fragen zu klären:

1. Treten im menschlichen Knochenmark durch Zugabe eines der beiden Vinca-Alkaloide in vitro gehäuft Mitosen im Stadium der frühen Metaphase in der Erythro- und in der Granulopoese auf?
2. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten bestehen in den Wirkungsweisen von Velbe und Vincristin auf die Mitosehäufigkeit im menschlichen Knochenmark?
3. Besteht eine Abhängigkeit von der Konzentration der Zusätze?
4. Ändern sich die Mitoseindices in der Granulo- und in der Erythropoese bei geringerer Konzentration von Velbe und Vincristin?
5. Ändert sich bei Mitosehemmung durch die Vinca-Alkaloide die prozentuale Verteilung der Knochenmarkszellen gegenüber den Kontrollversuchen?
6. Häufen sich bei bestimmten Zelltypen die arretierten Mitosen besonders an?
7. Sind die Wirkungsweisen von Velbe und Vincristin abhängig von den Krankheitsbildern der Patienten, die als Knochenmarkspender dienten?

In unserer Untersuchung verwenden wir nach Arbeiten von CARDINALI (12) und METZNER (Dissertation) für Vincristin eine Konzentration von 0,5 γ /ml. Da Velbe, wie klinische Ergebnisse zeigen, weniger toxisch ist als Vincristin, verwenden wir für Velbe das Doppelte der Vincristin-Konzentration, wie dies auch bereits von CARDINALI (11) angegeben wurde.

II. MATERIAL UND METHODE

Für unsere Versuche verwenden wir Knochenmark, das wir durch Sternalpunktion von fünf Patienten erhielten.

Sofort nach der Punktion wurde ein Teil des gewonnenen Knochenmarkes auf Objektträgern ausgestrichen, fixiert und später nach Pappenheim gefärbt. Diese Originalpräparate liefern die für die Klinik wichtigen diagnostischen Ergebnisse. Außerdem erhalten wir dadurch die Ausgangswerte zur Beurteilung der bei der Kultivierung eintretenden Zellveränderungen sowie der Reifungs- und Mitosephasenverschiebungen.

Das restliche Knochenmark wurde unter Hand-sterilen-Bedingungen in einem durch UV-Strahlen keimarm gehaltenen Raum nach der von BOLL (4) modifizierten Carrel'schen Technik kultiviert. Als Nährmedium für die Kulturen ohne Zusatz diente ein Koagulum aus:

- 50 % Eigenplasma, durch Sedimentation im silikonisierten Röhrchen gewonnen
- 40 % Eigenserum
- 10 % Corhormon^R der Chemiewerke Homburg (3fach verstärkt)

Der Nährboden für die Kulturen mit Zusatz (Velbe oder Vincristin) setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 50 % Eigenplasma
- 30 % Eigenserum
- 10 % Corhormon^R
- 10 % Velbe 10 γ /ml (in den Versuchen 1 - 3) gelöst in
physiol. NaCl
- 5 γ /ml (in den Versuchen 4 + 5) gelöst in
physiol. NaCl

oder:

10 % Vincristin 5 γ /ml (Versuche 1 - 3) gelöst in
aqua bidest.

2,5 γ /ml (Versuche 4 + 5) gelöst in
aqua bidest.

Nach der Koagulation legt man ein Markbröckchen auf den Nährboden, gibt einen Tropfen Serum, in dem sich bei den Versuchskulturen ebenfalls 10 % der Velbe- bzw. Vincristin-Lösung befindet, darauf, um ein Austrocknen zu vermeiden, und bedeckt alles mit einem Hohlschliffträger. Die Kultur wird umgedreht, mit verflüssigtem Hartparaffin luftdicht verschlossen und bei 37 °C als hängender Tropfen bebrütet.

Nach jeweils 9 bis 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden wurden die Kulturen auf Objektträgern ausgestrichen, fixiert und wie die Originalpräparate nach Pappenheim gefärbt.

Pro Zeiteinheit und pro Patient wurden jeweils drei bis vier Ausstriche mit dem Kontrollserum beziehungsweise mit dem Zusatz Velbe in der Endkonzentration von 1 γ /ml oder 0,5 γ /ml oder dem Zusatz Vincristin in der Endkonzentration von 0,5 γ /ml oder 0,25 γ /ml angefertigt.

Jeweils bei den am besten zu beurteilenden Präparaten je Zeiteinheit und je Patient wurden ca. 2000 Zellen differenziert. Hierzu musterten wir das Präparat mäanderförmig durch und zählten vorzugsweise die aufgelockerten Randpartien aus.

Folgende Zellen wurden erfaßt:

- a) Erythropoese, differenziert in:
Proerythroblast (PE)
basophiler Erythroblast (bE)

polychromatischer Erythroblast (pE)

oxyphiler Erythroblast (oE)

reifer Erythroblast (rE)

b) Granulopoese, differenziert in:

Myeloblast (Mb)

Promyelocyt (Pm)

neutrophiler Myelocyt (My)

eosinophiler Myelocyt (eo My)

basophiler Myelocyt (b My)

Promonocyt (Pmo)

Metamyelocyt (MM)

stabkerniger Granulocyt (Stab)

segmentkerniger Granulocyt (Seg)

eosinophiler segmentkerniger Granulocyt (eo Seg)

basophiler segmentkerniger Granulocyt (b Seg)

Monocyt (Mon)

c) Die übrigen Zellen, differenziert in:

Lymphoblast

Lymphocyt

kleine Reticulumzelle

große Reticulumzelle

phagocytierende Reticulumzelle

Plasmoblast

Plasmazelle

Megacaryocyt

Für die Differenzierung der Zellarten gelten die Kriterien nach BOLL (4, 5, 6).

Außerdem ist die Abgrenzung der einzelnen Mitosephasen wichtig. Als teilungsfähig werden nach ROHR (35) folgende Zellen angesehen:

Proerythroblast
basophiler Erythroblast
polychromatischer Erythroblast
oxyphiler Erythroblast

Myeloblast
Promyelocyt
Myelocyt
Metamyelocyt

Lymphoblast

Folgende Mitosephasen unterscheiden wir nach BOLL (4, 7):

1. Prophase (P):

Die Kernmembran ist aufgelöst. Die Nucleoli fehlen. Die Kernsubstanz ist aufgelockert. Die Chromosomen sind noch in einem festen Spirem angeordnet.

2. Frühe Metaphase (fM):

Die Chromosomen sind über die früheren Kerngrenzen hinaus ungeordnet verteilt (lockeres Spirem).

3. Späte Metaphase (sM):

Die Chromosomen sind verdoppelt und ordnen sich sternförmig zum Monaster beziehungsweise zur Äquatorialplatte an.

4. Anaphase (A):

Die Zelle ist meist oval. Die Chromosomen trennen sich und wandern jeweils zu den entgegengesetzten Spindelpolen; sie bilden einen Diaster.

5. Telophase (T):

Das Cytoplasma ist eingeschnürt, die getrennten Chromosomenknäule bilden ein lockeres Dispirem.

6. Rekonstruktionsphase (R):

Die beiden Zellen sind völlig getrennt, manchmal noch durch eine feine Plasmabrücke miteinander verbunden.

Die Kerne haben noch keine Kernmembran und auch noch keine Nucleoli ausgebildet. Die Chromosomen sind zu einem festen Spirem angeordnet.

Von den fünf verschiedenen Knochenmarkproben wurden 134 Ausstriche angefertigt, davon 44 ausgewertet. Insgesamt wurden 89 276 Zellen differenziert. Darauf entfielen 1489 Mitosen, 901 der Erythroblasten und 588 der Granuloblasten. Die Zählergebnisse wurden in Reifungskurven und karyologischen Kurven dargestellt. Außerdem wurden die Mitoseindices und die G/E-Indices bestimmt.

Die Reifungskurven (Abb. 2 - 4 und 6 + 7) geben die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellarten während der verschiedenen Kulturzeiten an, getrennt nach Erythropoese und Granulopoese. Auf der Ordinate wird die Zeit in Stunden angegeben, auf der Abszisse der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese bzw. der Granulopoese additiv aufgetragen. Aus den Versuchen 1 bis 3 und 4 bis 5 wird jeweils eine Mittelwertkurve (Abb. 8 und 9) angefertigt, wobei die in den Versuchsreihen pro Kulturzeit gefundenen Zellarten addiert werden und dann ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt und graphisch dargestellt wird.

In den karyologischen Kurven (Abb. 1 und 5) wird die prozentuale Verteilung der Mitosephasen graphisch dargestellt (Tab. 2).

Der Mitoseindex (Tab. 1) gibt Auskunft über das Verhältnis von gefundenen Mitosen zu gezählten teilungsfähigen Zellen (4). Er wird in ‰ angegeben. Man unterscheidet den "roten" Mitoseindex der Erythropoese und den "weißen" Mitoseindex der Granulopoese.

Der G/E-Index schließlich gibt das Verhältnis aller Vorstufen der Granulopoese zu allen der Erythropoese an (Tab. 3).

Signifikanzberechnung:

Die statistische Auswertung des Versuchsmaterials Zusatzkultur gegen Kontrolle erfolgte nach dem χ^2 -Verfahren nach PEARSON (34). Die Formel zur Berechnung von χ^2 lautet:

$$\chi^2_{mf} = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$$

B: Beobachtungswert

E: Erwartungswert

mf: Anzahl der Freiheitsgrade

Für jedes χ^2 läßt sich eine dazugehörige Wahrscheinlichkeit p berechnen. Wir entnehmen die zugehörigen p-Werte aus den χ^2 -Tafeln von BELITZ (2). p ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß die beiden Meßreihen aus ein und derselben Grundgesamtheit stammen (Beweis der Verschiedenheit).

Für die Beurteilung der p-Werte gilt:

p > 0,05

Die Differenz zwischen beiden Werten ist nicht signifikant. Es besteht also keine statistische Signifikanz.

- p > 0,01 Ob eine signifikante Differenz zwischen
p < 0,05 beiden Werten vorliegt, ist nicht eindeu-
tig. Man spricht von einem statistisch be-
deutsamen Wert.
- p < 0,01 Die Differenz zwischen beiden Werten ist
signifikant.
- p < 0,001 Die Differenz zwischen beiden Werten ist
hochsignifikant.

Folgende Patienten dienten als Knochenmarkspender:

1. Patient:

Brigitte S., 23 Jahre alt

Klinische Diagnose: Lupus erythematoses (visceralis mit nephro-
tischem Syndrom, Corticoid-Akne und Peni-
cillin-Allergie)

Blutbild vom 17. 9. 74:

Erythrocyten	4,8 Mill/ μ l
Hb	14,8 g %
HbE	30,9 pg
Leukocyten	4200/ μ l
Eosinophile	1 %
Stabkernige	9 %
Segmentkernige	62 %
Lymphocyten	25 %
Monocyten	3 %
Thrombocyten	316 000/ μ l
BSG	8/15
Blutzucker	84 mg %

Harnstoff	22 mg %
Kreatinin	0,7 mg %

Diagnose des Sternalpunktates vom 17. 9. 74:

Normaler Knochenmarkbefund.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

3 x 5 mg Methotrexat per os wöchentlich

Novalgin^R

Valium^R (7,5 mg)

2. Patient:

Anna G., 79 Jahre alt

Klinische Diagnose: Morbus Hodgkin

Blutbild vom 4. 7. 74:

Erythrocyten	3,8 Mill/ μ l
Hb	10,3 g %
HbE	26,8 pg
Leukocyten	4700/ μ l
Eosinophile	3 %
Segmentkernige	59 %
Lymphocyten	27 %
Monocyten	11 %
Throbocyten	190 000/ μ l
BSG	50/72
Blutzucker	100 mg %
Harnstoff	31 mg %
Kreatinin	0,6 mg %

Diagnose des Sternalpunktates vom 4. 7. 74:

Gesteigerte Erythropoese. Das gleichzeitig vermehrte Vorkommen von Plasmazellen, kleinen Reticulumzellen und Megaloblastoiden könnte für eine hepatogene Anämie sprechen. Ver-

mehrtes Vorkommen von Plasmazellen, monocytären Zellen und Megakaryocyten sind sekundäre Tumorzeichen.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Valium^R 5 mg

3. Patient:

Herbert Z., 58 Jahre alt

Klinische Diagnose: Hypotonie, Polyneuropathie

Blutbild vom 5. 2. 75:

Erythrocyten	3,99 Mill/ μ l
Hb	12,6 g %
HbE	32,3 pg
Leukocyten	14 000/ μ l
Eosinophile	2 %
Stabkernige	2 %
Segmentkernige	74 %
Lymphocyten	16 %
Monocyten	6 %
Blutzucker	90 mg %
Harnstoff	70 mg %
Kreatinin	1,3 mg %

Diagnose des Sternalpunktates vom 5. 2. 75:

Normaler Knochenmarkbefund.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

3 x 1 Amp. Akrinor^R im.

25 mg Ultracorten^R H

2 x 40 Tr. Novalgin^R

1 Teelöffel Nuran^R

3 x 2 Tbl. Dihydergot^R ret.

4. Patient:

Anna O., 71 Jahre alt

Klinische Diagnose: Hypertonus bei Schrumpfniere links
subklinischer Diabetes mellitus
cerebrovaskuläre Schwindelzustände

Blutbild vom 28. 5. 75:

Erythrocyten	5,4 Mill/ μ l
Hb	16,1 g %
HbE	30,7 pg
Leukocyten	12 100/ μ l
BSG	3/8
Blutzucker	114 mg % (nüchtern) 220 mg % (1 Std.) 162 mg % (2 Std.)
Harnstoff	141 mg %
Kreatinin	1,6 mg %

Diagnose des Sternalpunktates vom 28. 5. 75:

Angeregte Erythropoese, leicht angeregte Granulopoese, kein
Anhalt für Systemerkrankung.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Modenol^R 2 x 1 Drg.

5. Patient:

Hannchen G., 69 Jahre alt

Klinische Diagnose: IgG-Plasmocytom

Blutbild:

Erythrocyten	3,67 Mill/ μ l
Hb	10,7 g %
HbE	29,9 pg
Leukocyten	5000/ μ l

Eosinophile	3 %
Basophile	1 %
Stabkernige	3 %
Segmentkernige	28 %
Lymphocyten	54 %
Monocyten	8 %
AMZ	3 %
Thrombocyten	328 000/ μ l
BSR	113/140
IgA	25
IgG	4010
IgM	24
SGOT	1
SGPT	4

Diagnose des Sternalpunktates:

An der Punktionsstelle kein sicherer Anhalt für Plasmocytom.
Es ist differentialdiagnostisch auch ein M. Waldenstroem zu diskutieren.

III. ERGEBNISSE

Bei den Versuchen 1, 2 und 3 verwandten wir folgende Endkonzentrationen:

Velbe:	1 γ /ml
VCR:	0,5 γ /ml

Versuch 1, B.S.

1. Mitoseindices (Tab. 1)

In der Erythropoese sinkt der Mitoseindex nach 9 Std. in der Kontrollkultur unter den des Originalpräparates, bei Velbezug fällt er noch stärker ab, nur bei Zusatz von Vincristin steigt er etwas an.

Während der Mitoseindex nach 1 - 2 Tagen in der Kontrollkultur weiter abfällt, steigt er nach Velbezusatz bis 48 Std. nach Zusatz von Vincristin nur bis 24 Std. auf ein Vielfaches signifikant an (Tab. 4 und 5).

Unter Vinca-Alkaloid-Zusatz befinden sich die Mitosen fast ausschließlich im Stadium der Prophase und der fruhlen Metaphase (Abb. 1a, Tab. 2), in der Kontrollkultur sind die Mitosen in allen Phasen, außer der Rekonstruktionsphase, vertreten.

Bei Zusatz von Velbe steigen die Mitoseindices langsamer an als bei Zusatz von Vincristin (Tab. 1). Bei 24 Std. liegt bei beiden Zusätzen das Maximum der Mitoseindices. Der Abfall des Mitoseindex verläuft dann bei Velbe wesentlich langsamer als bei Vincristin. Während bei 48 Std. bei Velbe der Mitoseindex noch signifikant hoch ist (Tab. 4 und 5), sinkt er bei Vincristin nach Erreichen des Maximums bei 24 Std. rapide ab.

In der Granulopoese verringert sich der Mitoseindex im Verlauf der Kulturzeit bei allen drei Versuchsansätzen.

Während bei den beiden Vinca-Alkaloidzusätzen nur Prophasen und frühe Metaphasen zu finden sind, treten in der Kontrollkultur alle Mitosestadien auf (Abb. 1b, Tab. 2).

Wie bei der Erythropoes tritt der Effekt auf den Mitoseindex bei Vincristinzusatz schneller ein als bei der Kultur mit Velbe.

Tabelle 1: Mitoseindices

a) Erythropoes

Std.	Vers. I	Vers. II	Vers. III	Mit- tel	Vers. IV	Vers. V	Mit- tel
K o n t r o l l e							
0	21,0	25,0	19,14	21,71	18,59	20,89	19,74
9/12	13,88	30,89	-	22,38	-	-	-
24	5,24	4,75	39,68	16,5	10,38	26,79	18,6
48	11,49	0,0	17,7	9,7	17,14	25,0	21,07
V e l b e k u l t u r							
	1 ♂ /ml				0,5 ♂ /ml		
9/12	6,48	136,56	-	71,5	-	-	-
24	76,45	87,40	40,35	68,07	122,45	280,77	201,61
48	69,36	248,27	232,87	183,5	112,54	246,32	179,43
V i n c r i s t i n k u l t u r							
	0,5 ♂ /ml				0,25 ♂ /ml		
9/12	37,41	49,50	-	43,45	-	-	-
24	72,11	118,84	135,38	108,77	266,87	199,22	233,04
48	14,70	0,0	169,93	61,5	123,59	120,48	122,04

Tabelle 1: Mitoseindices

b) Granulopoese

Std.	Vers. I	Vers. II	Vers. III	Mit- tel	Vers. IV	Vers. V	Mit- tel
------	------------	-------------	--------------	-------------	-------------	------------	-------------

Kontrolle

0	10,29	6,28	3,34	6,63	8,52	4,31	6,42
9/12	13,73	3,61	-	8,67	-	-	-
24	10,3	3,12	6,42	6,6	3,13	9,52	6,3
48	2,52	4,38	2,99	3,3	11,98	11,81	11,89

Velbekultur

	1 ♂ /ml				0,5 ♂ /ml		
9/12	5,16	3,79	-	4,5	-	-	-
24	2,05	2,27	12,74	5,69	47,89	43,62	45,76
48	1,83	14,18	19,59	11,87	50,54	63,36	56,95

Vincristinkultur

	0,5 ♂ /ml				0,25 ♂ /ml		
9/12	1,8	7,5	-	4,65	-	-	-
24	2,02	11,12	8,97	7,37	67,36	50,50	58,93
48	0,0	1,27	13,03	4,8	60,21	45,75	52,98

Abb. 1a: Mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese
(Versuche 1 - 3, B.S., A.G., H.Z.)

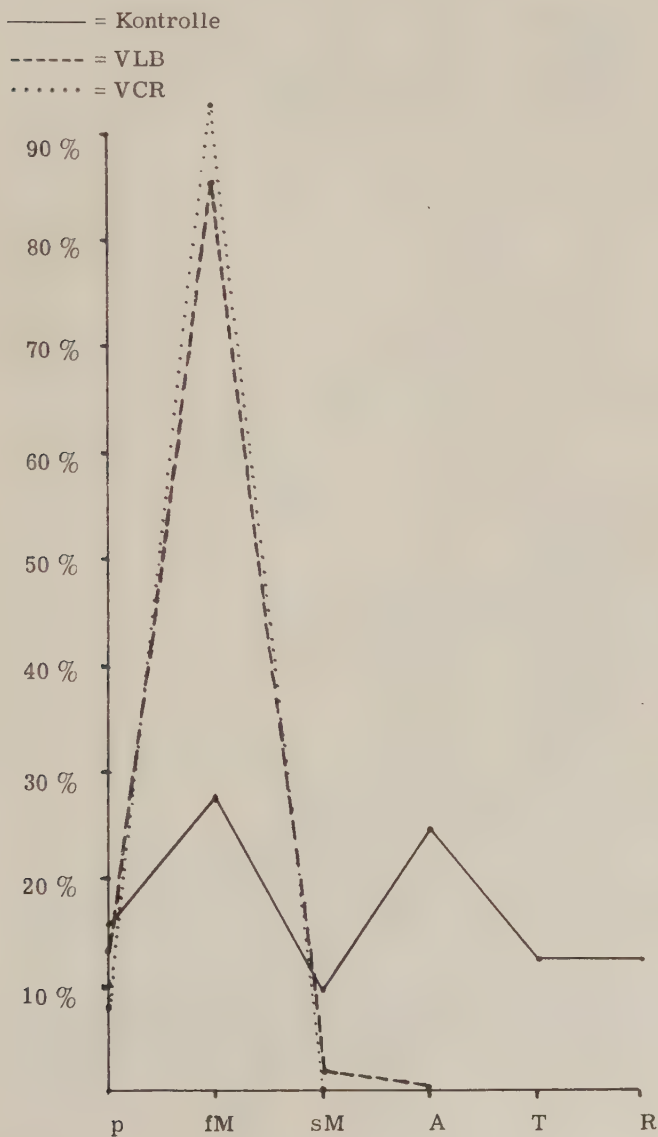


Abb. 1b: Mittlere Mitosephasenverteilung der Granulopoese
(Versuche 1 - 3, B.S., A.G., H.Z.)

— = Kontrolle
- - - = VLB
..... = VCR

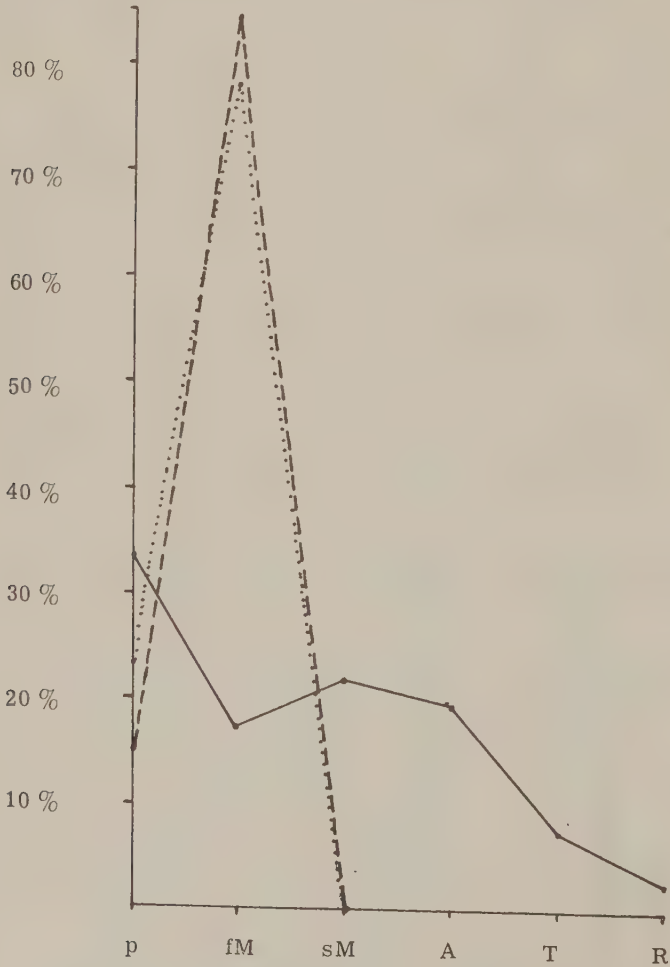


Tabelle 2: Mitosephasenverteilung

a) Erythroblasten-Mitosen

Phase	Versuche I II III			Versuche IV und V		
	Kontr.	Velbe 1 γ /ml	Vincr. 0,5 γ /ml	Kontr.	Velbe 0,5 γ /ml	Vincr. 0,25 γ /ml
P	5	27	16	5	27	10
fM	9	174	178	8	196	181
sM	3	4	1	4	0	0
A	8	1	0	2	0	0
T	4	0	0	0	0	0
R	4	0	0	1	0	0
Summe:	33	206	195	20	223	191

b) Granuloblasten-Mitosen

Phase	Versuche I II III			Versuche IV und V		
	Kontr.	Velbe 1 γ /ml	Vincr. 0,5 γ /ml	Kontr.	Velbe 0,5 γ /ml	Vincr. 0,25 γ /ml
P	14	10	9	7	23	19
fM	7	50	31	9	155	189
sM	9	0	0	11	0	0
A	8	0	0	2	0	0
T	3	0	0	2	0	0
R	1	0	0	1	0	0
Summe:	42	60	40	32	178	208

P = Prophase, fM = frühe Metaphase, sM = späte Metaphase,
A = Anaphase, T = Telophase, R = Rekonstruktionsphase.

2. Reifung der erythropoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 2a)

Betrachtet man die Reifungskurven der Erythropoese, so fällt bei Zusatz von Velbe im Gegensatz zur Kontrollkultur bei 9 Std. die Verschiebung zu den reiferen Zellformen hin auf. Die teilungsfähigen Zellen nehmen durch Velbe ab, obgleich noch keine Mitosehemmung vorliegt. Bei Vincristinzusatz ist diese Tendenz noch stärker; allerdings tritt hier auch bereits eine Mitosehemmung ein.

Nach längerer Kultivierung mit den Vinca-Alkaloiden nehmen die teilungsfähigen Zellen im Vergleich zur Kontrollkultur zu. Offensichtlich ist die Ausreifung durch die Mitosehemmung blockiert. Hierfür spricht auch, daß die Velbekultur bei 48 Std. mehr unreife Zellformen aufweist als die Vincristinkultur, da bei dem Zusatz mit Velbe bei 48 Std. der Mitoseindex und damit auch die Mitosehemmung größer sind als bei der Vincristinkultur.

3. Reifung der granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 2b)

In der Granulopoese nehmen im Gegensatz zu der Kontrollkultur schon nach 9 Std. die teilungsfähigen Zellen bei den beiden Zusatzkulturen relativ stark zu.

Während wir bei 24 Std. bei Vincristin nur eine geringe und bei Velbe keine Zunahme der teilungsfähigen Zellen beobachten, erreicht die Kontrollkultur durch die übliche Vermehrung der teilungsfähigen Zellen eine ähnliche Verteilungsrelation wie die Kulturen mit den beiden Zusätzen.

Abb. 2a: Erythropoese (B.S.)

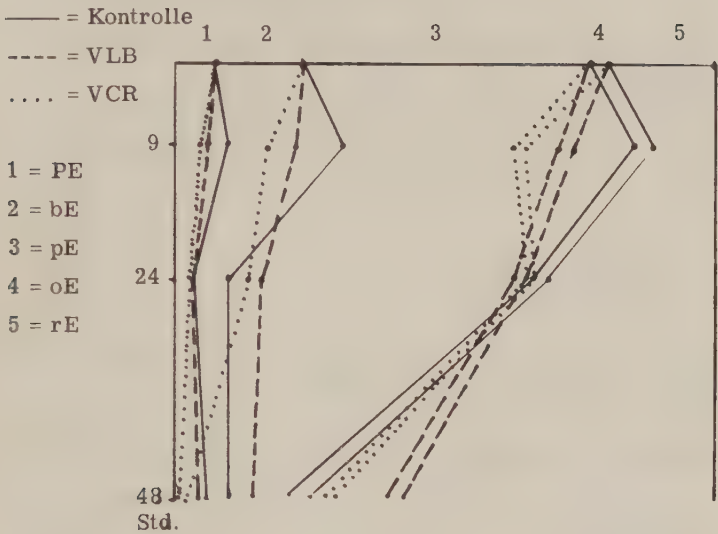
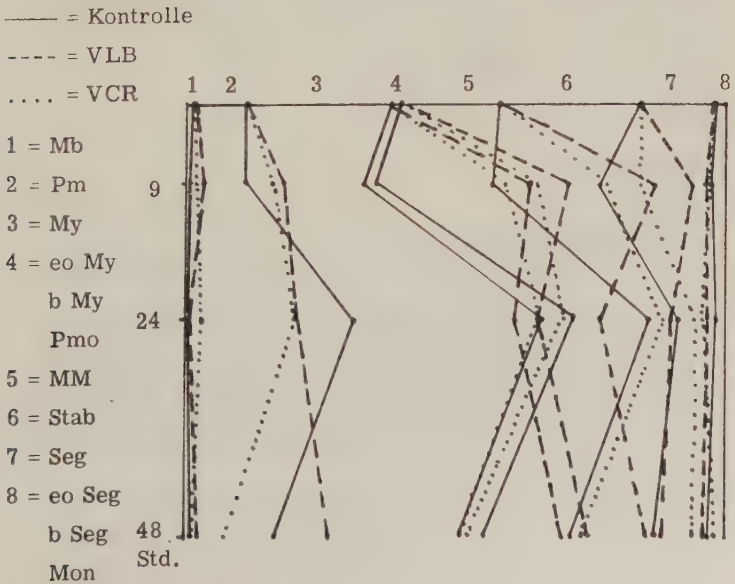


Abb. 2b: Granulopoese (B.S.)



Im weiteren Verlauf beobachten wir bei Velbe eine Verminderung der reifen Granulocyten, während bei der Vincristinkultur und bei der Kontrollkultur die reifen Zellformen langsam zunehmen.

Sowohl die Velbekultur als auch die Vincristinkultur sind nach zwei Tagen weniger ausgereift als die Kontrollkultur.

4. G/E-Indices (Tab. 3)

Der G/E-Index der Kontrollkultur bleibt mit Ausnahme von 24 Std., wo er stark abfällt, konstant.

Beide Zusätze senken den G/E-Index stark. Wie bereits aus den Reifungskurven ersichtlich, werden durch die Zusätze Velbe und Vincristin die ausgereiften Granulocyten reduziert. Dies schlägt sich auch bei den G/E-Indices nieder. Während normalerweise fast jeder zweite Granulocyt ausgereift ist, kommt bei Velbezusatz und bei Vincristinzusatz auf mehr als vier unreife Granulocyten ein reifer Granulocyt (Abb. 2b).

Versuch 2, A.G.

1. Mitoseindices (Tab. 1)

In der Erythropoese steigt der Mitoseindex bei 12 Std. sowohl in der Kontrollkultur als auch in der Vincristinkultur im Vergleich zum Originalpräparat etwas an. Bei der Velbekultur beobachten wir zur gleichen Zeit einen signifikanten (Tab. 4 + 5) Anstieg des Mitoseindex.

Tabelle 3: G/E-Indices

Std.	Vers. I	Vers. II	Vers. III	Mit- tel	Vers. IV	Vers. V	Mit- tel
	K o n t r o l l e						
0	4,1	3,31	6,09	4,5	4,4	3,04	3,72
9/12	4,3	2,74	-	3,5	-	-	-
24	1,2	2,8	4,1	2,7	2,89	4,2	3,54
48	4,7	4,3	4,87	4,6	2,58	3,38	2,98
	1,0 γ /ml		V e l b e k u l t u r		0,5 γ /ml		
9/12	1,78	4,39	-	3,1	-	-	-
24	2,3	1,92	2,7	2,3	1,7	2,5	2,09
48	2,9	3,65	2,52	3,0	2,13	2,09	2,11
	0,5 γ /ml		V i n c r i s t i n k u l t u r		0,25 γ /ml		
9/12	2,97	3,27	-	3,12	-	-	-
24	1,63	2,74	2,5	2,29	2,7	2,72	2,7
48	2,84	3,57	2,06	2,82	2,32	2,57	2,45

Während bei der Kontrollkultur nach 1 - 2 Tagen der Mitoseindex kontinuierlich absinkt, verzeichnen wir bei 24 Std. bei beiden Zusatzkulturen signifikante Erhöhungen der Mitoseindices (Tab. 4 + 5). Nach 48 Std. ist der Mitoseindex bei der Velbekultur noch statistisch signifikant erhöht, in der Vincristinkultur finden zu diesem Zeitpunkt keine Mitosen mehr statt.

In der Kontrollkultur sind die Mitosen in allen Phasen vertreten, bei den Vinca-Alkaloidkulturen finden wir außer einer spä-

ten Metaphase nur Mitosen im Stadium der Prophase oder der frühen Metaphase (Tab. 2, Abb. 1a).

Bei der Vincristinkultur beobachten wir wieder ein rasches Absinken des Mitoseindex nach Erreichen seines Maximums bei 24 Std. Die ungewöhnlich hohe Anzahl der Erythroblasten-Mitosen bei Velbezusatz nach 48 Std. ist vielleicht dadurch zu erklären, daß die Zellen im Präparat stark beschädigt waren, und daher große Gebiete durchgemustert werden mußten.

In der Granulopoese verringert sich bei der Kontrollkultur und bei der Velbekultur der Mitoseindex bei 12 Std. Bei Vincristinzusatz beobachten wir zur gleichen Zeit einen geringen Anstieg des Mitoseindex (Tab. 1).

Bei 24 Std. vermindern sich die Mitosewerte der Velbe- und der Kontrollkulturen geringfügig, bei der Vincristinkultur steigt der Mitoseindex weiter an.

Bei 48 Std. erhöht sich der Mitoseindex der Kontrollkultur etwas, bei der Velbekultur ist der Anstieg wesentlich höher. Die Vincristinkultur zeigt zur gleichen Zeit einen sehr geringen Mitoseindex.

Wie bei der Erythropoese fällt auch hier der Mitoseindex bei Vincristinzusatz nach dem Maximum nach 24 Std. wieder schnell ab.

In der Kontrollkultur sind alle Mitosestadien zu finden, bei den Kulturen mit Zusatz sieht man nur Prophasen und frühe Metaphasen (Abb. 1b, Tab. 2).

2. Reifung der erythropoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 3a)

Bei den Kulturen mit Zusatz sind bei 12 Std. etwas mehr reife Erythroblasten vorhanden als bei der Kontrollkultur. Diese Tendenz ist bei 24 Std. noch ausgeprägter. Durch den Vinca-Alkaloidzusatz nehmen die teilungsfähigen Zellen bei 12 Std. und bei 24 Std. ab.

Nach längerer Kultivierung mit den Vinca-Alkaloiden nehmen die teilungsfähigen Zellen im Vergleich zur Kontrollkultur zu. Die Ausreifung scheint durch die mitosehemmende Wirkung von Velbe und Vincristin blockiert zu sein.

Entsprechend den Mitoseindices weist die Velbekultur bei 12 Std. und 48 Std. mehr teilungsfähige Zellen auf als die Vincristinkultur. Bei 24 Std. enthält die Vincristinkultur entsprechend ihrem hohen Mitoseindex mehr unreife Erythroblasten als die Velbekultur.

3. Reifung der granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 3b)

In der Granulopoese nehmen bei 12 Std. die teilungsfähigen Zellen der Kulturen mit Velbe und Vincristin im Vergleich zur Kontrollkultur wieder stark zu. Die Vincristinkultur weist hier die meisten unreifen Zellformen auf, was mit dem im Vergleich zu den beiden anderen Kulturen hohen Mitoseindex zu erklären ist.

Bei 24 Std. erhöht sich die Zahl der teilungsfähigen Zellen wie üblich auch bei der Kontrollkultur. Sie erreicht aber nicht die Werte der beiden Zusatzkulturen.

Abb. 3a: Erythropoese (A.G.)

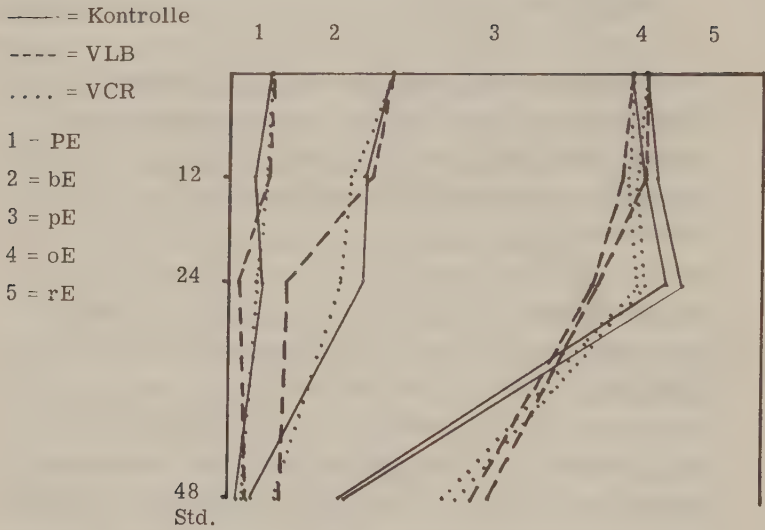
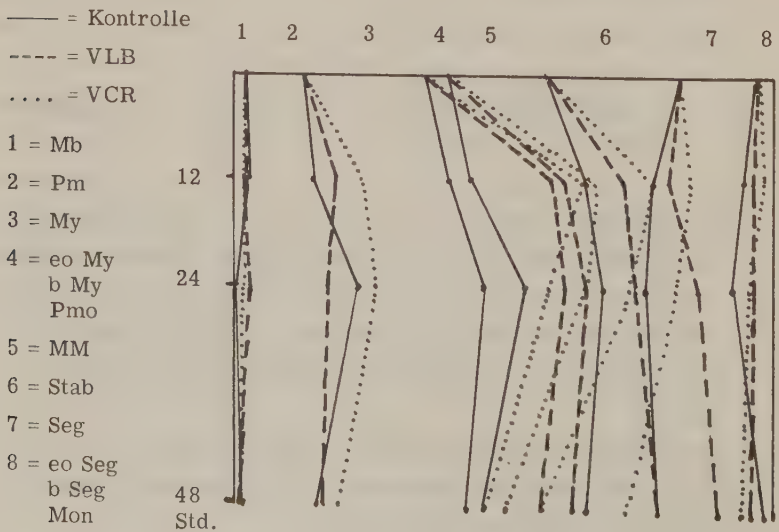


Abb. 3b: Granulopoese (A.G.)



Bei 48 Std. beobachten wir bei der Kontrollkultur etwas mehr reife Granulocyten. Bei der Vincristinkultur ist die Ausreifung im Vergleich zur Kontrolle stark ausgeprägt.

Bei der Velbekultur finden wir auch nach zwei Tagen weiterhin eine Tendenz zur Zunahme der teilungsfähigen Zellen, was vielleicht mit dem etwas erhöhten Mitoseindex zusammenhängt.

4. G/E-Indices (Tab. 3)

Die G/E-Indices der Kontrollkultur bleiben bis 24 Std. konstant, danach bemerkt man einen geringen Anstieg des G/E-Index.

Bei den beiden Vinca-Alkaloidkulturen liegen die G/E-Indices bei 12 Std. etwas höher als die entsprechenden Kontrollwerte, bei 24 Std. und 48 Std. sind die Indices niedriger als die der Kontrollkultur.

Versuch 3, H.Z.

1. Mitoseindices (Tab. 1)

In der Erythropoese steigen bei 24 Std. alle drei Mitoseindices im Vergleich zum Originalpräparat an. Bei Vincristin ist die Erhöhung bereits signifikant (Tab. 4 + 5).

Nach 48 Std. fällt der Mitoseindex der Kontrollkultur wieder ab, die Indices der beiden Vinca-Alkaloidkulturen dagegen sind signifikant erhöht.

Bei der Velbekultur steigen die Mitoseindices langsamer an als bei der Vincristinkultur; beide erreichen ihr Maximum bei 48 Std.

Während wir bei der Kontrollkultur alle Mitosephasen antreffen, finden wir bei den beiden Vinca-Alkaloidkulturen nur Prophasen und frühe Metaphasen (Abb. 1a, Tab. 2).

Bei 24 Std. steigt der weiße Mitoseindex bei allen drei Kulturen über den des Originalpräparates an (Tab. 1).

Bei 48 Std. fällt der Mitoseindex der Kontrollkultur wieder ab, die Indices der Zusatzkulturen sind signifikant erhöht (Tab. 4 und 5). Auch hier finden wir bei der Kontrollkultur alle Mitosephasen, bei den beiden Vinca-Alkaloidkulturen sind nur Prophasen und frühe Metaphasen vorhanden (Abb. 1b, Tab. 2).

2. Reifung der erythropoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 4a)

Bei 24 Std. ist die Verteilungsrelation bei allen drei Kulturen ähnlich.

Bei 48 Std. reift die Kontrollkultur weiter aus; bei den Kulturen mit Zusatz ist eine Reifungshemmung, bei Vincristin am stärksten ausgeprägt, zu verzeichnen. Dies ist auf die Mitosehemmung, die wieder offensichtlich die Ausreifung verhindert, zurückzuführen.

3. Reifung der granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 4b)

Nach 24 Std. nehmen bei der Granulopoese die teilungsfähigen Zellen der Kulturen mit Velbe und Vincristin stärker zu als bei der Kontrollkultur.

Abb. 4a: Erythropoese (H.Z.)

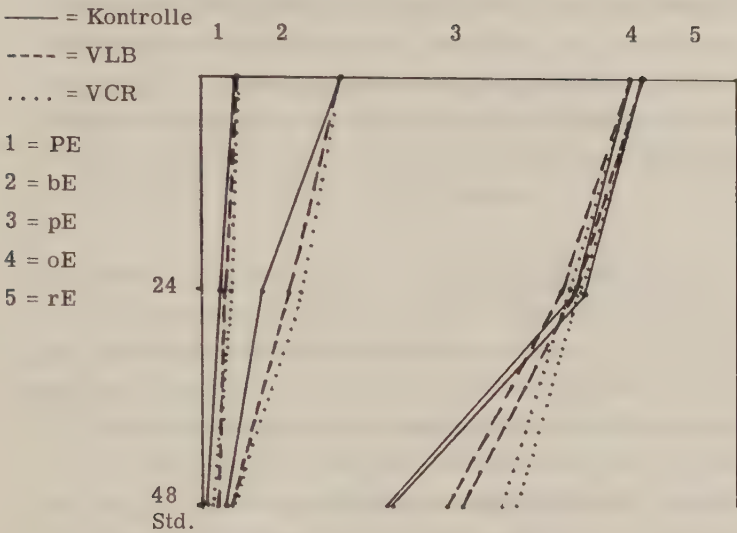
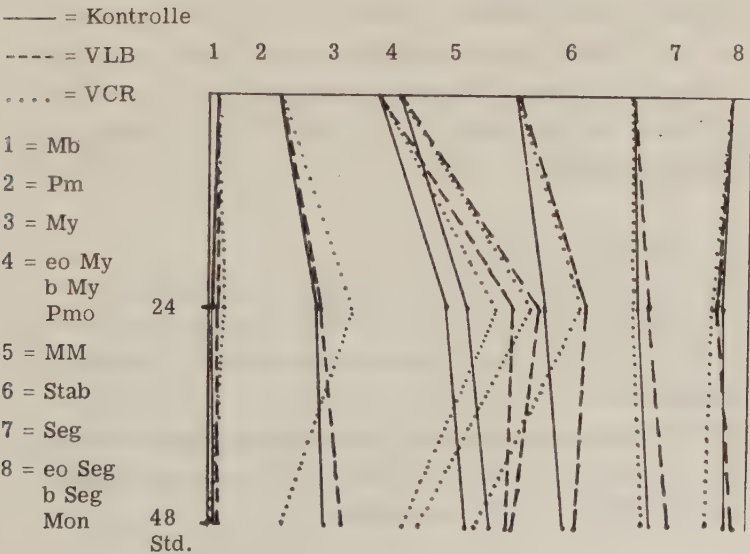


Abb. 4b: Granulopoese (H.Z.)



Die Kontrollkultur vermehrt noch bei 48 Std. den Anteil an teilungsfähigen Zellen und nähert sich so mit ihrer Verteilungsrelation der der Velbekultur, bei der die Zahl der unreifen Granulocyten nach zwei Tagen konstant bleibt.

Bei der Vincristinkultur bemerken wir eine starke Zunahme an reifen Granulocyten.

4. G/E-Indices (Tab. 3)

Der G/E-Index der Kontrollkultur fällt bei 24 Std. im Vergleich zum Originalpräparat ab, die Indices der Zusatzkulturen liegen zum gleichen Zeitpunkt erheblich unter dem Kontrollwert.

Bei 48 Std. haben sich die G/E-Indices in allen drei Kulturen gegenüber denen bei 24 Std. nicht verändert.

Bei den beiden folgenden Versuchen (4 und 5) verwandten wir

folgende Endkonzentration: Velbe: 0,5 γ /ml

VCR: 0,25 γ /ml

Versuch 4, A.O.

1. Mitoseindices (Tab. 1)

Der rote Mitoseindex der Kontrollkultur erniedrigt sich bei 24 Std., bei Velbe- und Vincristinzusatz steigt er signifikant an (Tab. 4 + 5).

Auch bei 48 Std. ist der Mitoseindex in der Erythropoese bei den Zusatzkulturen signifikant erhöht, bei der Kontrollkultur ist der Index nur gering angestiegen.

Wieder sind bei der Kontrollkultur alle Mitosephasen zu finden, bei den Vinca-Alkaloidversuchen sind nur Prophasen und frühe Metaphasen vertreten (Abb. 5a, Tab. 2).

Während der rote Mitoseindex der Vincristinkultur nach einem starken Anstieg bei 24 Std. bei 48 Std. schon wieder um die Hälfte abfällt, bewegt sich der Mitoseindex der Velbekultur während der gleichen Zeit um ein und denselben Wert.

Die niedrigeren Konzentrationen (Velbe 0,5 γ /ml, VCR 0,25 γ /ml) verursachen bei beiden Vinca-Alkaloidkulturen bei 24 Std. und bei 48 Std. signifikante Zunahmen der weißen Mitoseindices (Tab. 4 + 5).

Der Index der Kontrollkultur dagegen fällt bei 24 Std. stark ab, bei 48 Std. sehen wir wieder eine deutliche Zunahme. Wie bei der Erythropoese sehen wir auch hier bei den Vinca-Alkaloidkulturen nur Prophasen und frühe Metaphasen, in der Kontrollkultur sind dagegen alle Mitosestadien zu finden (Abb. 5b, Tab. 2).

Der weiße Mitoseindex der Vincristinkultur erreicht wie auch schon bei der Erythropoese bei 24 Std. seinen Maximalwert, bei 48 Std. fällt er bereits ab, der weiße Mitoseindex der Velbekultur steigt im Gegensatz dazu bis zu 48 Std. kontinuierlich an.

2. Reifung der erythropoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 6a)

Bei 24 Std. sind bei den Vinca-Alkaloidkulturen die teilungsfähigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle vermehrt, die Vincristinkultur weist hier die meisten teilungsfähigen Erythroblasten auf.

Abb. 5a: Mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese
(Versuche 4 und 5, A.O., H.G.)

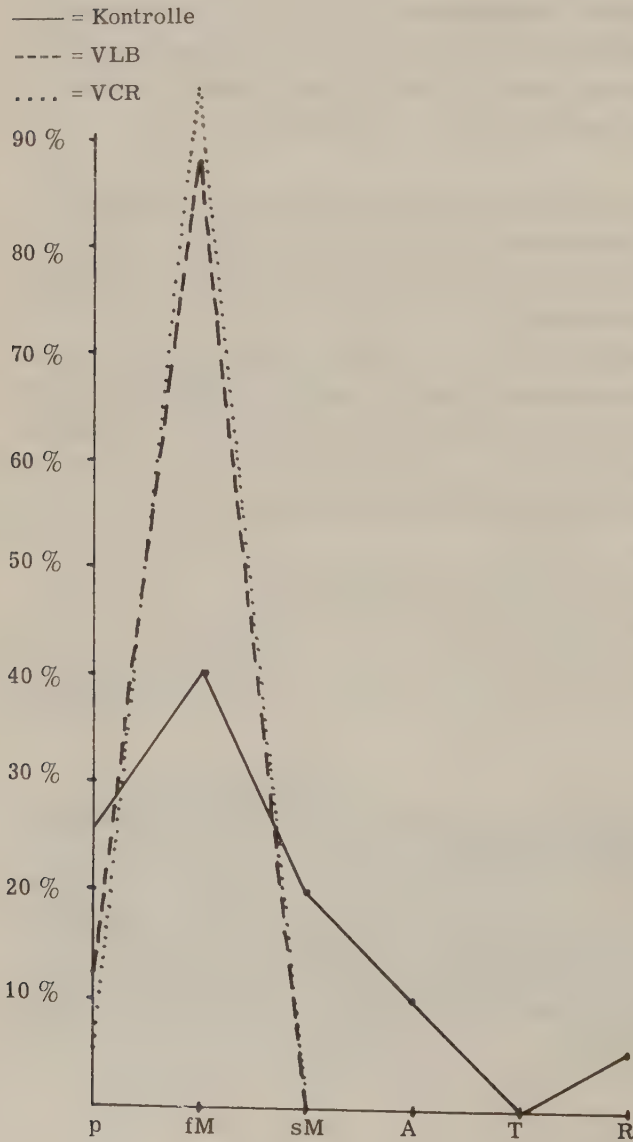


Abb. 5b: Mittlere Mitosephasenverteilung der Granulopoese
(Versuche 4 und 5, A.O., H.G.)

— = Kontrolle

---- = VLB

.... = VCR

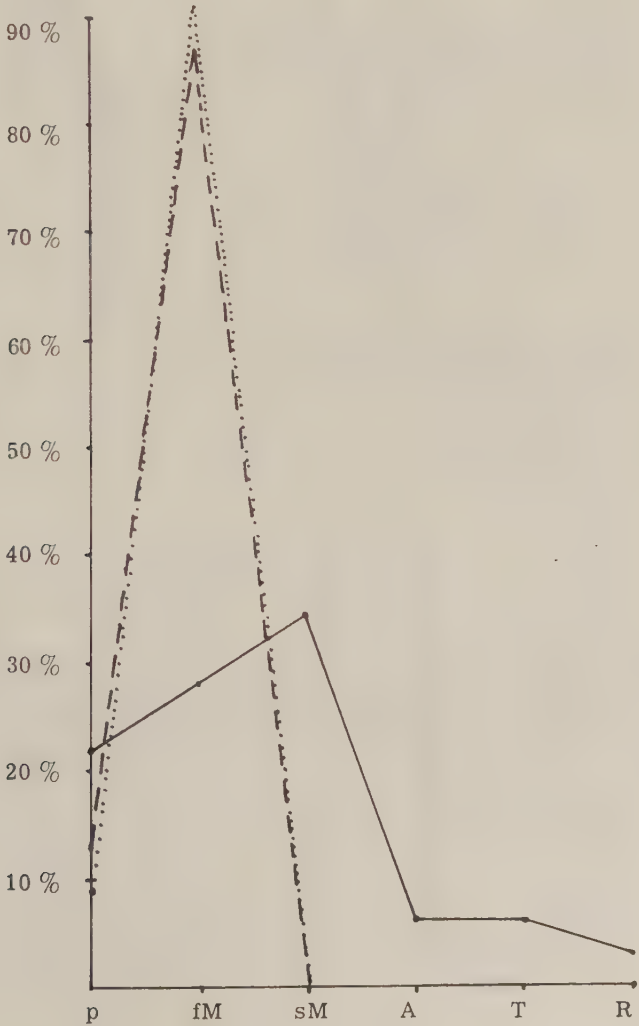


Abb. 6a: Erythropoese (A.O.)

— = Kontrolle

---- = VLB

.... = VCR

1 = PE

2 = bE

3 = pE

4 = oE

5 = rE

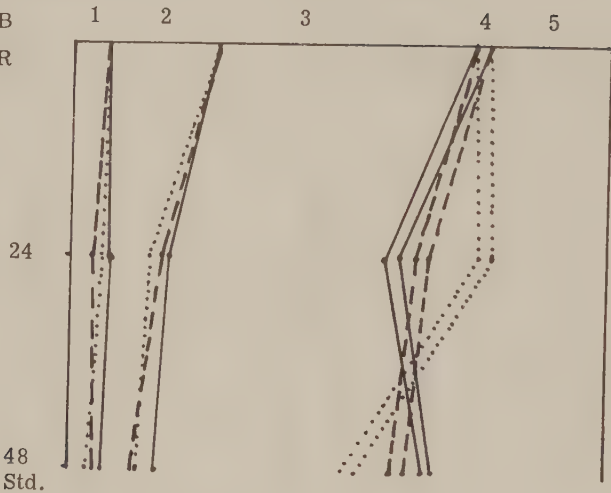


Abb. 6b: Granulopoese (A.O.)

— = Kontrolle

---- = VLB

.... = VCR

1 = Mb

2 = Pm

3 = My

4 = eo My

b My

Pmo

5 = MM

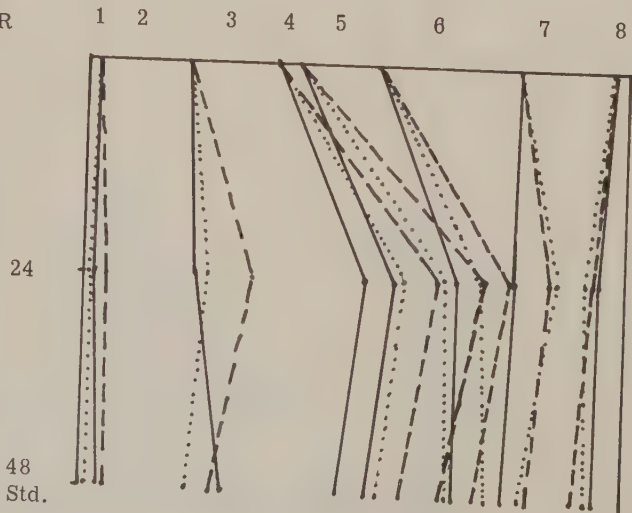
6 = Stab

7 = Seg

8 = eo Seg

b Seg

Mon



Bei 48 Std. sehen wir bei der Kontrollkultur eine atypische Verschiebung zu den unreifen Zellen hin.

Die beiden Zusatzkulturen zeigen im Vergleich dazu eine verstärkte Ausreifung, die bei der Vincristinkultur am ausgeprägtesten auftritt.

3. Reifung der granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 6b)

In der Granulopoese nehmen die teilungsfähigen Zellen der Kontrollkultur bei 24 Std. zu. Diese Tendenz ist bei den beiden Vinca-Alkaloidkulturen ausgeprägter, wobei die Velbekultur am wenigsten reife Zellen enthält.

Bei 48 Std. bleibt die Verteilungsrelation zwischen den drei Kulturen ähnlich. Lediglich die Velbekultur erhöht etwas den Anteil an reifen Granulocyten.

Bei allen drei Kulturen ist die Ausreifung gestört, am wenigsten jedoch bei den Kontrollen.

4. G/E-Indices (Tab. 3)

Der G/E-Index der Kontrollkultur fällt bei 24 Std. im Vergleich zum Original stark ab. Die Werte der Vinca-Alkaloidkulturen liegen zum gleichen Zeitpunkt etwas niedriger als bei der Kontrollkultur.

Ein ähnliches Verhalten der drei Kulturen zueinander beobachten wir auch bei 48 Std.

Versuch 5, H.G.

1. Mitoseindices (Tab. 1)

Bei der Erythropoese liegt der Mitoseindex der Kontrollkultur bei 24 Std. und bei 48 Std. etwas über dem Ausgangswert. In den beiden Vinca-Alkaloidkulturen beobachten wir zur gleichen Zeit einen signifikanten Anstieg der Mitoseindices (Tab. 4 + 5).

Bei der Kontrollkultur finden wir alle Mitosephasen, bei den Kulturen mit Velbe oder Vincristin sehen wir nur Prophasen und frühe Metaphasen (Abb. 5a, Tab. 2).

Auch hier fällt wieder auf, daß bei der Vincristinkultur nach Erreichen des Mitosemaximums schnell der Index wieder absinkt.

In der Granulopoese erhöht sich der Mitoseindex bei der Kontrollkultur bis zu 48 Std. kontinuierlich. Bei den Vinca-Alkaloidkulturen sind signifikant hohe Mitoseindices bei 24 Std. und bei 48 Std. zu beobachten (Tab. 4 + 5).

Auch hier finden wir in der Kontrollkultur alle Mitosephasen vertreten, in den Kulturen mit Zusatz dagegen nur Prophasen und frühe Metaphasen (Abb. 5b, Tab. 2).

Die Vincristinkultur erreicht bei 24 Std. schon ihren höchsten Mitoseindex, der danach wieder abfällt, bei der Velbekultur verzeichnen wir einen Anstieg der weißen Mitoseindices bis 48 Std.

2. Reifung der erythropoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 7a)

Bei 24 Std. ist die Verteilung der Reifungskurven bei allen drei Kulturen ähnlich, wobei die Kontrollkultur die meisten teilungsfähigen Zellen aufweist.

Bei 48 Std. reift die Kontrollkultur weiter aus, die Velbekultur zeigt zur gleichen Zeit, offensichtlich wegen des hohen Mitoseindex, eine Reifungshemmung, während die Vincristinkultur noch stärker ausreift als die Kontrollkultur.

3. Reifung der granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 7b)

Die Kontrollkultur vermehrt bei 24 Std. ihre teilungsfähigen Zellen. Diese Tendenz ist bei den beiden Zusatzkulturen wesentlich ausgeprägter.

Während bei 48 Std. die Kontrollkultur ausreift, bewirkt der hohe Mitoseindex der Zusatzkulturen eine Reifungshemmung.

4. G/E-Indices (Tab. 3)

Der G/E-Index der Kontrollkultur steigt bei 24 Std. im Vergleich zum Original an. Zur gleichen Zeit senken beide Zusätze den G/E-Index.

Bei 48 Std. fällt der G/E-Index der Kontrollkultur wieder ab. Ähnlich verhalten sich auch die Zusatzkulturen.

Wie bereits aus den Reifungskurven ersichtlich, werden durch die Zusätze Velbe oder Vincristin die ausgereiften Granulocyten

Abb. 7a: Erythropoese (H.G.)

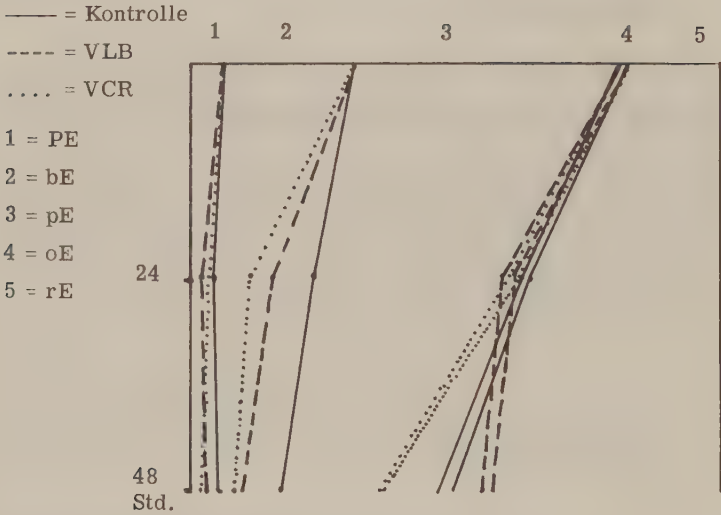
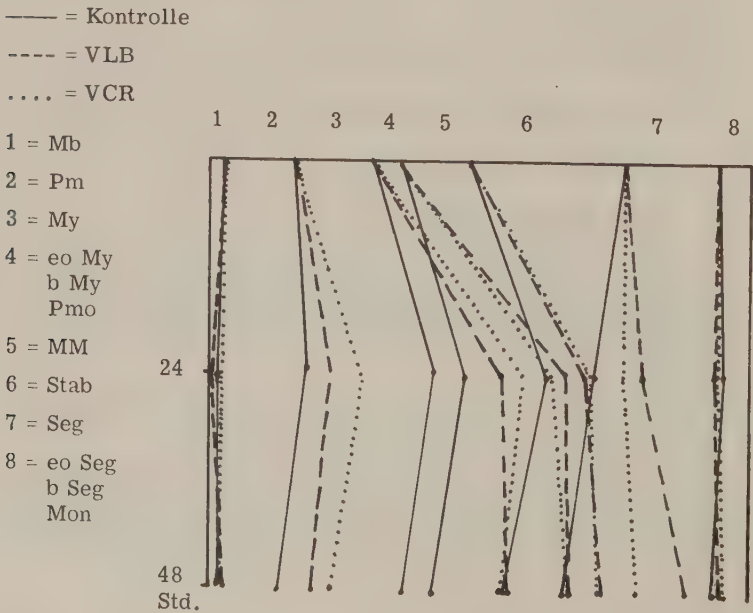


Abb. 7b: Granulopoese (H.G.)



reduziert. Diese Hemmung der Granulopoese drückt sich deutlich im G/E-Index aus.

Auswertung der karyologischen Kurven nach Zusatz von 1 μ /ml Velbe oder 0,5 μ /ml Vincristin (Versuch 1 - 3, Abb. 1a und b, Tab. 2)

In der Erythropoese finden wir bei den Kulturen mit Zusatz eine enorme Anhäufung von Mitosen im Stadium der frühen Metaphase. Bei dem Zusatz Velbe sind fast 85 % aller Mitosen im Stadium der frühen Metaphase, bei dem Zusatz Vincristin sind es sogar über 90 %.

Während die Häufigkeit der Prophasen der Kulturen mit Zusatz im Bereich der Kontrollwerte liegt, können die prozentualen Anteile der späten Metaphasen und Anaphasen vernachlässigt werden. Telophasen und Rekonstruktionsphasen werden bei den Zusatzkulturen nicht gefunden.

Ein ähnliches Bild sehen wir auch in der Granulopoese. Während der Anteil der Prophasen bei den Kulturen mit Zusatz mit ca. 20 % unter dem Wert der Kontrollkulturen liegt, finden wir bei der Velbekultur über 80 % frühe Metaphasen und bei der Vincristinkultur etwas weniger als 80 %. Die Vergleichswerte der Kontrollkultur liegen ungefähr bei 15 %. Späte Metaphasen, Anaphasen, Telophasen und Rekonstruktionsphasen werden bei Velbe- oder Vincristinzusatz nicht gefunden.

Auswertung der karyologischen Kurven nach Zusatz von
0,5 γ /ml Velbe oder 0,25 γ /ml Vincristin (Versuch 4 + 5,
Abb. 5a und b, Tab. 2)

Sowohl in der Erythropoese wie in der Granulopoese finden wir in den Velbe- und Vincristinkulturen wie bei den ersten drei Versuchen eine starke Anhäufung an frühen Metaphasen. Während die Prophasen noch ungefähr zu 10 % vertreten sind, findet man in den Kulturen mit Zusatz weder späte Metaphasen noch Anaphasen, keine Telophasen und auch keine Rekonstruktionsphasen.

Sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese erreichen die frühen Metaphasen der Vincristinkulturen die Höchstwerte. Der Anteil an frühen Metaphasen in den Velbekulturen ist etwas geringer.

Die beiden Medikamente Velbe und Vincristin sind starke Mitoseblocker, was auch aus den karyologischen Kurven (Abb. 1 und 5, Tab. 2) hervorgeht. Beim Vergleich der beiden Zusätze miteinander fällt auf, daß bei der Erythropoese die Vincristinkulturen die meisten frühen Metaphasen aufweisen, während bei der Granulopoese auch einmal die Velbekulturen den Höchstwert erreichen.

Ergebnisse der statistischen Auswertung

Obwohl bei den Kulturen mit Zusatz die Zahl der roten (Vers. 1 - 5) und der weißen (Vers. 4 und 5) Mitosen augenscheinlich ansteigt, wurden dennoch statistische Berechnungen durchgeführt, um exakte Aussagen machen zu können.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4) stellen wir die Ergebnisse der Signifikanzberechnungen der Mitosehäufigkeit dar. Dabei sind in den äußersten Spalten links und rechts die Kulturarten aufgeführt, die jeweils miteinander rechnerisch verglichen werden. In den dazwischenliegenden Spalten stehen die Ergebnisse jeweils für 9-12 Std., 24 Std. und 48 Std.

Tabelle 4:

Erythroblasten-Mitosen:

Versuch	9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch
I. Kon- trolle	$\chi^2_{1=1,034}$ $p=0,3$	$\chi^2_{1=32,277}$ $p=10^{-8}$	$\chi^2_{1=3,764}$ $p=0,05$	I. Velbe
II. Kon- trolle	$\chi^2_{1=19,656}$ $p=10^{-5}$	$\chi^2_{1=29,709}$ $p<10^{-7}$	$\chi^2_{1=17,138}$ $p=0,000\ 04$	II. Velbe
III. Kon- trolle	- -	$\chi^2_{1=0,002}$ $p>0,3$	$\chi^2_{1=19,981}$ $p<10^{-5}$	III. Velbe

Versuch	9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch
I. Kon- trolle	$\chi^2_{1=3,047}$ $p=0,08$	$\chi^2_{1=30,917}$ $p < 10^{-7}$	$\chi^2_{1=0,040}$ $p > 0,3$	I. Vincristin
II. Kon- trolle	$\chi^2_{1=1,380}$ $p=0,24$	$\chi^2_{1=41,307}$ $p < 10^{-10}$	- -	II. Vincristin
III. Kon- trolle	- -	$\chi^2_{1=12,869}$ $p=0,0004$	$\chi^2_{1=14,070}$ $p=0,00015$	III. Vin- cristin
I. Velbe	$\chi^2_{1=9,076}$ $p=0,0027$	$\chi^2_{1=0,043}$ $p > 0,3$	$\chi^2_{1=4,837}$ $p=0,03$	I. Vincristin
II. Velbe	$\chi^2_{1=10,325}$ $p=0,0015$	$\chi^2_{1=1,602}$ $p=0,2$	$\chi^2_{1=36,419}$ $p=10^{-9}$	II. Vincristin
III. Velbe	- -	$\chi^2_{1=16,152}$ $p=0,00006$	$\chi^2_{1=2,138}$ $p=0,15$	III. Vin- cristin

Granuloblasten-Mitosen:

Versuch	9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch
I. Kon- trolle	$\chi^2_{1=3,531}$ p=0,06	$\chi^2_{1=5,211}$ p=0,025	$\chi^2_{1=0,124}$ p>0,3	I. Velbe
II. Kon- trolle	$\chi^2_{1=0,004}$ p>0,3	$\chi^2_{1=0,120}$ p>0,3	$\chi^2_{1=4,846}$ p=0,027	II. Velbe
III. Kon- trolle	- -	$\chi^2_{1=1,937}$ p=0,17	$\chi^2_{1=11,966}$ p=0,0006	III. Velbe
I. Kon- trolle	$\chi^2_{1=9,618}$ p=0,002	$\chi^2_{1=5,332}$ p=0,02	$\chi^2_{1=2,572}$ p=0,15	I. Vincristin
II. Kon- trolle	$\chi^2_{1=1,211}$ p=0,27	$\chi^2_{1=4,323}$ p=0,038	$\chi^2_{1=1,368}$ p=0,24	II. Vincristin
III. Kon- trolle	- -	$\chi^2_{1=0,385}$ p>0,3	$\chi^2_{1=5,599}$ p=0,018	III. Vin- cristin

Versuch	9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch
I. Velbe	$\chi^2_{1=1,717}$ p=0,19	$\chi^2_{1=0}$ -	$\chi^2_{1=1,868}$ p=0,17	I. Vincristin
II. Velbe	$\chi^2_{1=1,285}$ p=0,26	$\chi^2_{1=5,201}$ p=0,022	$\chi^2_{1=8,546}$ p=0,0035	II. Vincristin
III. Velbe	- -	$\chi^2_{1=0,591}$ p>0,3	$\chi^2_{1=0,919}$ p>0,3	III. Vincristin

Erythroblasten-Mitosen:

Versuch	24 Std.	48 Std.	Versuch
IV. Kontrolle	$\chi^2_{1=26,442}$ p<10 ⁻⁶	$\chi^2_{1=22,675}$ p<10 ⁻⁵	IV. Velbe
V. Kontrolle	$\chi^2_{1=42,065}$ p=10 ⁻¹⁰	$\chi^2_{1=33,391}$ p=10 ⁻⁸	V. Velbe
IV. Kontrolle	$\chi^2_{1=61,675}$ p<10 ⁻¹⁰	$\chi^2_{1=25,261}$ p<10 ⁻⁶	IV. Vincristin
V. Kontrolle	$\chi^2_{1=27,177}$ p<10 ⁻⁶	$\chi^2_{1=11,262}$ p=0,0008	V. Vincristin

Versuch	24 Std.	48 Std.	Versuch
IV. Velbe	$\chi^2_{1=16,495}$ $p < 10^{-4}$	$\chi^2_{1=0,133}$ $p > 0,3$	IV. Vincristin
V. Velbe	$\chi^2_{1=2,883}$ $p=0,09$	$\chi^2_{1=7,054}$ $p=0,008$	V. Vincristin

Granuloblasten-Mitosen:

Versuch	24 Std.	48 Std.	Versuch
IV. Kontrolle	$\chi^2_{1=36,349}$ $p=10^{-9}$	$\chi^2_{1=20,739}$ $p < 10^{-5}$	IV. Velbe
V. Kontrolle	$\chi^2_{1=20,029}$ $p < 10^{-5}$	$\chi^2_{1=26,531}$ $p < 10^{-6}$	V. Velbe
IV. Kontrolle	$\chi^2_{1=54,167}$ $p < 10^{-10}$	$\chi^2_{1=28,631}$ $p=10^{-7}$	IV. Vincristin
V. Kontrolle	$\chi^2_{1=25,419}$ $p < 10^{-6}$	$\chi^2_{1=15,386}$ $p=0,0001$	V. Vincristin
IV. Velbe	$\chi^2_{1=2,792}$ $p=0,09$	$\chi^2_{1=0,699}$ $p > 0,3$	IV. Vincristin
V. Velbe	$\chi^2_{1=0,435}$ $p > 0,3$	$\chi^2_{1=2,416}$ $p=0,12$	V. Vincristin

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) sind zur Verschaffung eines schnellen Überblickes noch einmal die Ergebnisse der Signifikanzberechnungen dargestellt. Die Einteilung stimmt mit der der vorangehenden Tabelle (Tab. 4) überein.

- ++ bedeutet: $p < 0,001$ Differenz ist hochsignifikant
- + bedeutet: $p < 0,01$ Differenz ist signifikant
- . bedeutet: $p > 0,01$ } Differenz statistisch bedeutsam
- $p < 0,05$ }
- bedeutet: $p > 0,05$ Differenz ist nicht signifikant
- / bedeutet: keine Ergebnisse

Tabelle 5:

Erythroblasten-Mitosen:

A.)	Versuch	9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch
	I.	-	++	.	I.
a)	II. Kontrolle	++	++	++	II. Velbe
	III.	/	-	++	
	I.	-	++	-	I.
b)	II. Kontrolle	-	++	/	II. Vincristin
	III.	/	++	++	III.
	I.	+	-	.	I.
c)	II. Velbe	+	-	++	II. Vincristin
	III.	/	++	-	III.

Granuloblasten-Mitosen:

B.)	Versuch		9-12 Std.	24 Std.	48 Std.	Versuch	
	I.		-	.	-	I.	
a)	II.	Kontrolle	-	-	.	II.	Velbe
	III.		/	-	++	III.	
	I.		+	.	-	I.	
b)	II.	Kontrolle	-	.	-	II.	Vincristin
	III.		/	-	.	III.	
	I.		-	/	-	I.	
c)	II.	Velbe	-	.	+	II.	Vincristin
	III.		/	-	-	III.	

Erythroblasten-Mitosen:

C.)	Versuch		24 Std.	48 Std.	Versuch	
	IV.	Kontrolle	++	++	IV.	Velbe
a)	V.	Kontrolle	++	++	V.	Velbe
	IV.	Kontrolle	++	++	IV.	Vincristin
b)	V.	Kontrolle	++	++	V.	Vincristin
	IV.	Velbe	++	-	IV.	Vincristin
c)	V.	Velbe	-	+	V.	Vincristin

Granuloblasten-Mitosen:

D.) Versuch		24 Std.	48 Std.	Versuch	
a)	IV. Kontrolle	++	++	IV.	Velbe
	V. Kontrolle	++	++	V.	Velbe
b)	IV. Kontrolle	++	++	IV.	Vincristin
	V. Kontrolle	++	++	V.	Vincristin
c)	IV. Velbe	-	-	IV.	Vincristin
	V. Velbe	-	-	V.	Vincristin

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Konzentrationen 1 γ /ml Velbe und 0,5 γ /ml Vincristin (Versuche 1 - 3) die Erythroblasten-Mitoseindices der Zusatzkulturen im Vergleich zu den Kontrollkulturen signifikant erhöhen. Bei den Velbekulturen sind nach 24 bis 48 Std. signifikante Differenzen zu finden (nur in Versuch 3 nimmt der Mitoseindex erst nach 48 Std. zu), während bei den Vincristinkulturen die Differenzen nur bei 24 Std. signifikant sind (Ausnahme Versuch 3: der Mitoseindex nimmt auch noch bei 48 Std. zu).

Die Granuloblasten-Mitoseindices sind bei diesen drei Versuchen nur vereinzelt signifikant erhöht.

Bei den beiden Versuchen (4 und 5) mit den Konzentrationen 0,5 γ /ml Velbe und 0,25 γ /ml Vincristin sind alle Mitoseindices der Erythroblasten und der Granuloblasten nach 24 und nach 48 Kulturstunden im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

Während bei den Erythroblasten-Mitoseindices Unterschiede zwischen den Kulturen mit Velbe und Vincristin nachgewiesen wurden, sind in der Granulopoese keine signifikanten Differenzen zwischen diesen beiden Konzentrationen zu finden.

Auswertung der beiden Mittelwert-Reifungskurven (Abb. 8a, b und 9a, b) und Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 1 - 3 und 4 und 5

1. Die Veränderungen der erythropoetischen und der granulopoetischen Mittelwert-Mitoseindices (Abb. 8a - 9b) stimmen mit den einzelnen Kulturen überein (Tab. 1, S. 19/20). Eine Zusammenfassung der einzelnen Mitoseindices mit Berücksichtigung der Signifikanz haben wir bereits auf Seite 52 gegeben.

2. In den gemittelten Reifungskurven der Erythropoese (Abb. 8a) wird bei den Kontrollen zunächst bei 9/12 Std. eine Zunahme der unreifen Erythroblasten deutlich. Bei Zusatz von Velbe (1 γ /ml) und Vincristin (0,5 γ /ml) nehmen bei 9/12 Std. die teilungsfähigen Zellen ab. Da diese Abnahme nur durch den Versuch 1 entstand (Versuch 3 wurde nicht bei 9/12 Std. untersucht) kann sie nicht verwertet werden.

Bei 24 und 48 Std. nehmen bei den gemittelten Kontrollkurven die reifen Erythroblasten fortschreitend zu. Bei den gemittelten Vinca-Alkaloidkulturen sind nach 24 Std. weniger teilungsfähige Zellen vorhanden als in der Kontrollkultur. Umgekehrt verhält es sich nach 48 Std., wo die Kulturen mit Velbe oder Vincristin fast um die Hälfte mehr teilungsfähige Zellen enthalten als die Kontrolle. Beide Zusätze verursachen also eine Reifungshemmung der Erythropoese. Bei den Versuchen 1 und 2 sind bei

Abb. 8a: Mittelwertkurven der Erythropoese (Versuch 1 - 3,
B.S., A.G., H.Z.)

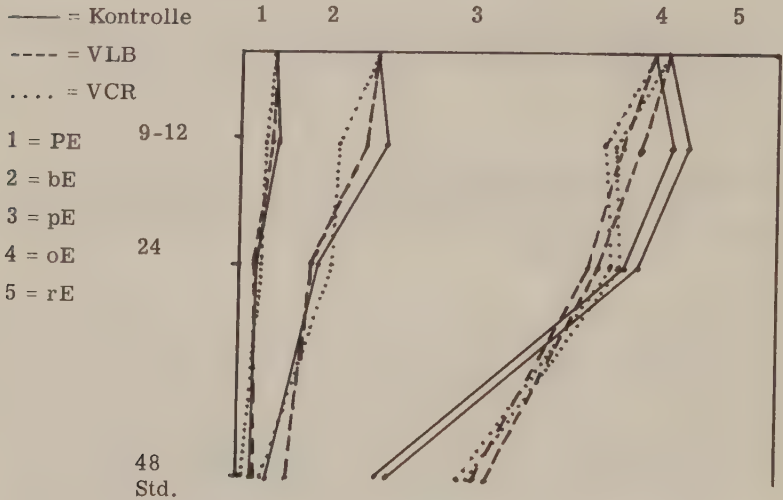


Abb. 8b: Mittelwertkurven der Granulopoese (Versuche 1 - 3)

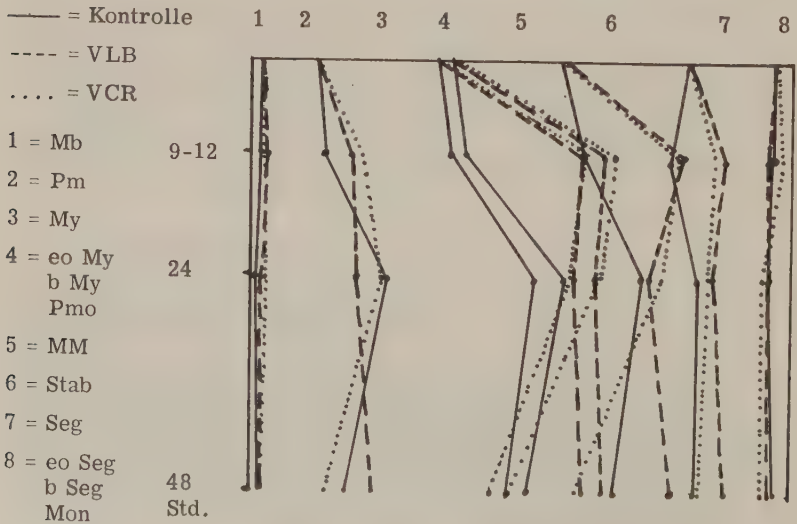


Abb. 9a: Mittelwertkurven der Erythropoese (Versuche 4 und 5,
A.O., H.G.)

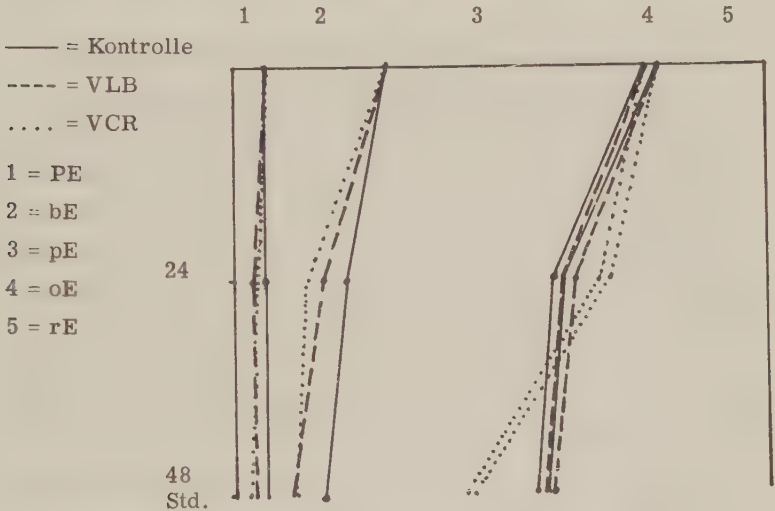
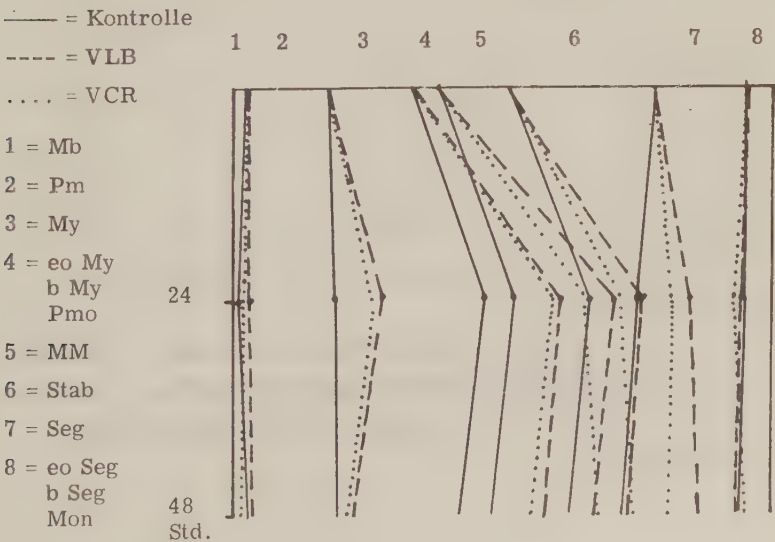


Abb. 9b: Mittelwertkurven der Granulopoese (Versuche 4 und 5)



48 Std. die Velbekulturen unreifer als die Vincristinkulturen, bei Versuch 3 verhält es sich umgekehrt.

In der Erythropoese der zweiten Versuchsserie (Abb. 9a) mit den niedrigeren Konzentrationen von 0,5 γ /ml Velbe und 0,25 γ /ml Vincristin verlaufen die gemittelte Kurve der Kontrollkulturen und die gemittelte Velbekurve parallel. Der Anteil an unreifen Erythroblasten wird stets geringer, wobei die Velbekultur etwas unreifer ist als die Kontrollkultur.

Bei der gemittelten Vincristin-Kurve findet sich bei extrem hohem Mitoseindex von 233 ‰ bei 24 Std. eine starke Zunahme der unreifen Erythroblasten, bei 48 Std. dagegen reift die Kultur aus, beziehungsweise sind die arretierten Mitosen inzwischen degeneriert. Sie enthält nun relativ mehr reife Erythroblasten als die beiden anderen Kulturen. Das entspricht auch den Originalkurven beider Versuche (Abb. 6 und 7).

3. In der Granulopoese (Abb. 8b) zeigt sich bei den höheren Konzentrationen von 1 γ /ml Velbe und 0,5 γ /ml Vincristin in den Mittelwert-Kurven (Versuche 1 - 3) nach 9/12 Std. eine Vermehrung der teilungsfähigen Zellformen gegenüber der Kontrolle.

Während bei der Mittelwert-Kontrollkurve bei 24 Std. noch weiterhin eine Zunahme an teilungsfähigen granulocytopoetischen Vorstufen zu sehen ist, verringert sich ihr Anteil bei den Vincristin-Alkaloidkulturen.

Bei 48 Std. zeigt die gemittelte Kontroll-Kurve eine allmähliche Ausreifung. Eine stärkere Ausreifung finden wir bei der gemittelten Vincristinkultur. Die gemittelte Velbekultur zeigt eine Reifungshemmung.

Der Verlauf der Mittelwertkurven entspricht im allgemeinen dem Verlauf der Originalkurven (Abb. 2, 3 und 4).

In der Granulopoese (Abb. 9b) der zweiten Versuchsserie mit einer Velbe-Konzentration von 0,5 γ /ml und einer Vincristin-Konzentration von 0,25 γ /ml beobachten wir bei allen drei Mittelwertkurven, daß bei 24 Std. der Anteil der teilungsfähigen Zellformen ansteigt. Die Mittelwertkurve der Kontrolle enthält dabei am wenigsten unreife Zellen, die Mittelwertkurve der Vincristinkulturen zeigt etwas mehr unreife Zellformen und bei der Mittelwertkurve der Velbekulturen sind die meisten teilungsfähigen Zellen vorhanden.

Während bei 48 Std. sowohl die Kontrollen als auch die Velbekulturen verstärkt ausreifen, finden wir bei der gemittelten Vincristinkultur eine Reifungshemmung.

Allerdings muß hier hinzugefügt werden, daß bei den Originalkurven (Abb. 7b) auch bei der Velbekultur des 5. Versuches eine Reifungshemmung zu beobachten ist.

4. Mittelwert-G/E-Index (Tab. 3, S. 27)

Der Mittelwert-G/E-Index der drei Kontrollkulturen der ersten Versuchsserie (Versuch 1 - 3) verringert sich von 0 auf 9/12 Std. etwas. Ähnlich verhalten sich die Mittelwert-G/E-Indices der beiden Zusatzkulturen mit den Konzentrationen 1 γ /ml Velbe und 0,5 γ /ml Vincristin.

Nach 24 Std. fallen alle mittleren G/E-Indices weiter ab. Bei 48 Std. bemerken wir bei allen drei Mittelwert-Kulturen wieder einen Anstieg der G/E-Indices.

Zu allen Kulturzeiten liegen die Werte der Zusatzkulturen unter denen der gemittelten Kontrollkulturen, so daß hier relativ mehr Erythroblasten vorkommen.

Die Mittelwert-G/E-Indices der Kontrollkulturen der zweiten Versuchsserie (Versuch 4 und 5) nehmen kontinuierlich bis 48 Std. ab.

Die Mittelwert-G/E-Indices der Vinca-Alkaloidkulturen mit Velbe 0,5 γ /ml und Vincristin 0,25 γ /ml liegen ebenso unter den entsprechenden Werten der Kontrolle, wobei der G/E-Index der Vincristinkulturen etwas höher ist als der der Velbekulturen.

IV. DISKUSSION

An vier Versuchsserien mit fünf verschiedenen menschlichen Knochenmarkproben werden *in vitro* die Wirkungen von Vinblastin (Velbe) und Vincristin auf die Proliferation der Erythroblasten und der Granuloblasten miteinander verglichen.

Nach den Versuchen von METZNER geb. Albert (Dissertation), die auf Untersuchungen von CARDINALI (12), der eine Vincristinkonzentration von 0,5 mg/kg verwandte, basierten, wählten wir für Vincristin eine Konzentration von 0,5 γ /ml. Wie klinische Ergebnisse zeigen, ist Vincristin toxischer als Velbe. Ausgehend von Versuchsansätzen von CARDINALI (11) wählten wir deswegen für Velbe die Konzentration von 1 γ /ml, also das Doppelte der Vincristinkonzentration.

Diese von uns zunächst bei der ersten Versuchsserie angewandten Konzentrationen erschienen uns zu hoch, da wir in den Kulturen viele zerstörte Zellen fanden, besonders bei der Granulopoese. Daher verminderten wir die Konzentrationen bei der zweiten Versuchsserie auf je die Hälfte. Mit dem neuen Kulturmedium, das also 0,5 γ /ml Velbe oder 0,25 γ /ml Vincristin enthielt, haben wir offensichtlich eine optimale Konzentration getroffen.

Die Ergebnisse mit der höheren Konzentration können für die Beurteilung der Erythropoese herangezogen werden. Da bei der Granulopoese mit dieser höheren Konzentration kaum noch Mitosen zu erkennen waren, ist eine statistisch begründete Aussage über deren Vorkommen nicht möglich.

In der Versuchsserie mit der niedrigeren Konzentration dagegen sind sowohl bei der Erythropoese als auch bei der Granulopoese sehr viele Mitosen gefunden worden, so daß eine sta-

tistisch gesicherte Mitosehemmung und deren Wirkung auf die Ausreifung festgestellt werden konnte.

Wie bereits auf Grund anderer Untersuchungen (3, 9, 10, 14, 15, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 33, 36, 37) erwartet, fanden wir bei der Erythropoese, aber auch bei der Granulopoese viele in der frühen Metaphase arretierte Mitosen.

Als Kriterium unserer vergleichenden Untersuchung über die Wirkungen von Velbe und Vincristin auf die Mitosen im menschlichen Knochenmark benutzen wir den Mitoseindex.

Zunächst konnten wir, wie auch schon andere Autoren (10, 27, 28), einen statistisch signifikanten Anstieg der roten Mitoseindices nach 24 und 48 Std. unter der Einwirkung von Velbe und von Vincristin nachweisen. Die Maxima der roten Mitoseindices bewegen sich bei beiden Medikamenten in der gleichen Größenordnung.

Weiterhin konnte statistisch signifikant aufgezeigt werden, daß bei den Vincristinkulturen schnell nach dem Erreichen des Maximums bei 24 Std. die Mitosehäufigkeit wieder erheblich abnimmt, während bei den Velbekulturen die Mitosehemmung längere Zeit (48 Std.) anhält, meist sogar erst bei 48 Std. das Maximum erreicht wird.

Dieser Unterschied im Verhalten beider Medikamente wurde nicht nur bei der Erythropoese beider Versuchsserien gefunden, sondern auch bei der Granulopoese der Versuchsserie mit der niedrigeren Konzentration. Selbst bei den Granuloblasten-Mitosen der Versuchsserie mit der höheren Konzentration ist eine solche Tendenz zu erkennen.

Auch bei den Granuloblasten-Mitosen der Versuchsserie mit der niedrigeren Konzentration konnte eine signifikante Erhöhung

der Mitoseindices unter Einwirkung von Velbe oder Vincristin nachgewiesen werden.

Die weißen Mitoseindex-Maxima beider Zusätze mit der geringeren Konzentration bewegen sich in der gleichen Größenordnung.

Im Vergleich zu den Werten der roten Mitoseindices ist bei der Granulopoese aber in dieser Versuchsserie nach dem Zusatz von Velbe oder Vincristin der prozentuale Anteil an Mitosen niedriger. Ob dies auf eine schwächere Wirkung der Zusätze Velbe oder Vincristin auf die Granulopoese als auf die Erythropoese zurückzuführen ist, oder ob es sich hier um spezielle Eigenarten, wie Lebensdauer, Proliferation, Empfindlichkeit, Milieuabhängigkeit usw. der weißen und der roten Knochenmarkzellen handelt, bleibt dahingestellt.

Anhand der verschiedenartigen Ergebnisse (Abb. 2a, 3a, 4a, 6a, 7a) gelingt es nicht, Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Wirkung der beiden Medikamente Velbe und Vincristin auf die Erythropoese nachzuweisen.

Bei der Granulopoese beobachten wir nach 24 Kulturstunden bei allen Kulturen eine Vermehrung unreifer, teilungsfähiger Granuloblasten, wie dies von BOLL (4, 6, 8) für die Granulopoese schon ohne Zusatz angegeben wurde. Die Kulturen mit dem Zusatz Velbe oder Vincristin weisen im Vergleich zur Kontrolle wesentlich mehr unreife Zellen auf (Abb. 2b, 3b, 4b, 6b, 7b), wie dies BOLL (4) schon mit dem Mitoseblocker Colchicin nachgewiesen hatte.

Während die Kulturen ohne Zusatz beschleunigt bei 48 Std. ausreifen, sehen wir bei den Velbekulturen der Versuche mit der höheren Konzentration und bei den Velbe- und Vincristinkulturen der Versuche mit der niedrigeren Konzentration bei 48 Std.

eine verminderte Ausreifung, die bei letzteren sogar signifikant ist.

Auch hier lassen sich aus dem Verhalten der einzelnen Kulturen keine eindeutigen Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in den Wirkungen der beiden Medikamente Velbe und Vincristin ziehen. Bemerkenswert ist nur, daß die Velbekulturen stets verzögert ausreifen. Deswegen scheint der Zusatz Velbe toxischer auf die Granulopoese zu wirken als Vincristin, wie es klinisch beobachtet wird.

Die G/E-Indices, die nach BOLL (5) in den ersten 48 Std. normalerweise absinken und erst am dritten Tag einen erhöhten Wert gegenüber dem Ausgangswert als Zeichen der Ausreifung der Erythropoese erfahren, zeigen bis auf zwei Ausnahmen (Fall 1 bei 24 Std., Fall 2 bei 12 Std.) bei den Kulturen mit Velbe und Vincristin stets niedrigere Werte als die entsprechenden Kontrollkulturen. Durch den Zusatz Velbe oder Vincristin werden die granulopoetischen Knochenmarkzellen stark zerstört. Besonders bei den Versuchen mit der höheren Konzentration konnten wir die durch die Zusätze verursachten Zerstörungen anhand der morphologisch geschädigten Zellen feststellen.

Trotzdem kann man bei einem Vergleich der G/E-Indices der Velbekulturen mit denen der Vincristinkulturen keine wesentlichen Unterschiede finden.

Kehren wir nun zu den eingangs dieser Untersuchung gestellten Fragen zurück (S. 6).

Die erste Frage, ob nach Zusatz von Velbe oder Vincristin gehäuft Mitosen besonders im Stadium der frühen Metaphase auftreten, kann bejaht werden. Nach Zusatz von 1 γ /ml Velbe oder

0,5 γ /ml Vincristin (Vers. 1 - 3) sind die Mitosen besonders in der Erythropoese stark gehäuft (Abb. 1, Tab. 1 und 2). Nach Zusatz von 0,5 γ /ml Velbe oder 0,25 γ /ml Vincristin (Vers. 4 und 5) finden wir sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese eine weit über der Norm liegende frühe Metaphasenvermehrung (Abb. 5, Tab. 1 und 2).

Auch auf die zweite Frage nach den unterschiedlichen Wirkungsweisen von Velbe und Vincristin auf die Mitosehäufigkeit im menschlichen Knochenmark gibt diese Untersuchung eine Antwort.

Die Vincristinkulturen erreichen ihr Maximum an Mitosen zeitlich vor den Velbekulturen. Während die Velbekulturen die hohe Mitosezahl noch nach zwei Tagen aufweisen, beobachten wir bei den Vincristinkulturen nach Erreichen des Maximums nach 24 Std. einen rapiden Abfall des Mitoseindex.

Mit Frage drei soll geklärt werden, ob eine Abhängigkeit von den Konzentrationen der Zusätze zu beobachten ist.

Während wir bei der Versuchsserie mit der höheren Konzentration nur bei der Erythropoese eine Mitosevermehrung sehen, finden wir bei der Versuchsserie mit der schwächeren Konzentration sowohl bei der Erythropoese als auch bei der Granulopoese vermehrt Mitosen.

Bei der stärkeren Konzentration an Velbe und Vincristin fanden wir in den Präparaten viele zerstörte weiße Knochenmarkzellen. Bei vielen dieser zerstörten Zellen beobachteten wir mitoseähnliche Strukturen. Dies veranlaßte uns, eine herabgesetzte Konzentration der Medikamente Velbe und Vincristin zu verwenden. Unsere Vermutung bestätigte sich. Nun traten in der Granulopoese vermehrt Mitosen auf, besonders im Stadium der frühen

Metaphase. Die Granuloblasten scheinen auf die hohen Konzentrationen von Velbe und Vincristin mit verstärktem Zerfall zu reagieren, was auch erklären könnte, weshalb in der Versuchsserie mit der höheren Konzentration kaum weiße Mitosen gezählt wurden.

Die vierte Frage, ob sich bei veränderter Konzentration von Velbe und Vincristin die Mitoserate ändert, ist für die Granulopoese bereits in Frage drei beantwortet worden.

Bei der Erythropoese bemerkt man bei einem Zahlenvergleich der roten Mitoseindices bei den verschiedenen Konzentrationen, daß bei schwächerer Konzentration an Velbe und Vincristin der prozentuale Anteil an Mitosen ansteigt. Diese Tatsache kann damit erklärt werden, daß analog zur Granulopoese auch bei der Erythropoese der Zerfall der Knochenmarkzellen bei geringerer Konzentration der Zusätze vermindert ist.

In Frage fünf wird gefragt, ob die prozentuale Verteilung der Knochenmarkzellen durch Velbe- und Vincristinzusatz gegenüber den Kontrollversuchen verändert ist.

In der Versuchsserie mit den höheren Konzentrationen an Velbe und Vincristin beobachten wir bei den erythropoetischen Reifungskurven Verzögerungen bei der Ausreifung der Kulturen.

Bei den granulopoetischen Reifungskurven dieser Serie ist im ersten Versuch die Ausreifung beider Kulturen mit Zusatz gehemmt, bei den Versuchen 2 und 3 sind die Kulturen mit dem Zusatz Velbe in der Ausreifung gehemmt, während die Kulturen mit Vincristin nach 48 Std. verstärkt ausgereift sind. Dies entspricht der zeitlich begrenzten Mitosehemmung unter Vincristin entgegen den Velbeversuchen.

Während die Erythropoese in den Vincristinkulturen mit der niedrigeren Konzentration stärker ausreift als bei der Kontrolle, beobachten wir bei den Velbekulturen mal eine Reifungshemmung und mal eine Reifungsbeschleunigung bei 48 Std.

Bei der Granulopoese sind durch die schwächere Konzentration die unreifen Zellen vermehrt. Es ist eine Reifungshemmung der Granulopoese entstanden.

Zur Beantwortung der sechsten Frage, ob sich bei bestimmten Zellarten unter Einfluß von Velbe und Vincristin die Mitosen häufen, wurde eine Tabelle (Tab. 6) auf der folgenden Seite angefertigt. Aus ihr ersieht man, daß die größte Mitoseaktivität bei den basophilen und polychromatischen Erythroblasten und bei den Promyelocyten und Myelocyten zu finden ist. Dies ist aber keine Besonderheit, denn die teilungsfähigen Zellen setzen sich ja zum größten Teil aus diesen Zellarten zusammen.

Die siebente Frage, ob die Wirkungsweisen von Velbe und Vincristin abhängig sind von den Krankheitsbildern der Knochenmarkspender, kann sicherlich verneint werden. Die Krankheitsbilder der fünf Patienten sind recht unterschiedlich, so daß die Einheitlichkeit der Reaktion auf die Zusätze Velbe und Vincristin auffällt.

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind in der linken Spalte die Stunden angezeigt, die übrigen Spalten enthalten, aufgeteilt nach Zellarten und getrennt für die Versuchsserien I (Vers. 1 - 3) und II (Versuch 4 und 5), die Mitoseindices.

Tabelle 6: Mitoseindices der einzelnen Zellarten in ‰

Std.		PE		bE		pE	
		1-3	4+5	1-3	4+5	1-3	4+5
0		81,3	37,7	29,2	21,3	11,3	17,1
9/	K	54,6	-	42,7	-	11,9	-
12	VLB	35,1	-	65,8	-	45,5	-
	VCR	39,2	-	84,1	-	32,3	-
24	K	57,8	0	21,8	16,4	7,4	20,9
	VLB	84,1	44,4	77,5	119,0	62,5	185,2
	VCR	42,4	66,7	97,1	97,1	103,1	227,3
48	K	32,3	0	0	20,0	10,2	20,9
	VLB	45,5	47,6	114,9	100,0	185,2	169,5
	VCR	50,0	30,3	0	72,5	94,3	129,9

Std.		Mb		Pm		My		Eos-Pmo	
		1-3	4+5	1-3	4+5	1-3	4+5	1-3	4+5
0		0	0	23,4	11,1	5,9	8,6	0	7,7
9/	K	0	-	33,9	-	12,7	-	0	-
12	VLB	0	-	9,8	-	4,6	-	0	-
	VCR	14,9	-	8,1	-	4,3	-	0	-
24	K	0	0	12,1	9,7	6,7	8,9	0	0
	VLB	0	33,3	11,7	39,8	5,3	60,9	0	19,5
	VCR	9,3	35,1	9,7	55,8	8,5	76,9	4,4	11,1
48	K	0	12,9	19,4	17,5	3,6	14,5	0	12,7
	VLB	14,5	11,4	16,9	64,5	12,9	76,3	0	4,3
	VCR	19,2	43,5	6,2	60,6	4,0	66,7	0	15,4

V. ZUSAMMENFASSUNG

An Knochenmarkkulturen von fünf Sternalpunktaten wird die Wirkung von Velbe^R und Vincristin^R auf die Mitosen im menschlichen Knochenmark untersucht. Wir verwendeten folgende Konzentrationen:

Velbe 1 γ /ml in drei Versuchen und

0,5 γ /ml in zwei Versuchen

VCR 0,5 γ /ml in drei Versuchen und

0,25 γ /ml in zwei Versuchen.

Nach 9 bis 12, 24 und 48 Stunden wurden Ausstrichpräparate angefertigt, von denen je 2000 Zellen differenziert und die Mitosen klassifiziert wurden.

Danach wurden die Mitose- und G/E-Indices bestimmt, sowie die Reifungskurven und die karyologischen Kurven gezeichnet. Schließlich wurden die mittleren Mitose- und G/E-Indices errechnet und die Reifungskurven in Mittelwertkurven zusammengefaßt.

Als Kontrolle dienten Ausstriche von Kulturen, die statt der Zusätze Velbe oder Vincristin nur mit dem Eigenserum des entsprechenden Patienten angesetzt waren.

Ergebnisse:

Die doppelte Velbekonzentration entspricht in der Wirkung der einfachen Vincristinkonzentration.

Nach Zusatz von Velbe oder Vincristin kommt es zu einer Arretierung der Mitosen im Stadium der frühen Metaphase. Die Mitoseindices der Erythropoese steigen dadurch bei allen fünf Versuchen signifikant an. Für die Mitoseindices der Granulopoese kann eine Signifikanz nur für die niedrigeren Konzentrationen von 0,5 γ /ml Velbe und 0,25 γ /ml Vincristin aufgezeigt wer-

den. Vermutlich sind die höheren Konzentrationen cyto-toxisch.

Die Vincristinkulturen erreichen bei 24 Std. den maximalen Mitosewert, danach fällt der Mitoseindex schnell ab.

Bei den Velbekulturen dagegen steigt der Mitoseindex häufig noch bis 48 Kulturstunden an.

Entsprechend den Mitoseindex-Erhöhungen vermehren sich die teilungsfähigen Zellen. Eine Ausreifung wird durch die Mitosehemmung in beiden Versuchsserien blockiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Beer, C.T.: Brit. Emp. Cancer Campaigne 33 d Ann. Rep. 487 (1955)
2. Belitz, H. J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht. Ernst Klett Verlag, Heft 3, 83 (1960)
3. Bensch, K. G., Malawista, S. E.: Microtubule crystals: A new biophysical phenomenon induced by Vinca Alkaloids. Nature (Lond.) 218, 1176 (1968)
4. Boll, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag, Heidelberg (1966)
5. Boll, I., Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193 (1968)
6. Boll, I., Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulocytopoese in vitro. Blut 19, 257 (1969)
7. Boll, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. I. Granuloblastenmitosen. Folia haemat. 3, 78 (1958)
8. Boll, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulocytopoese. Folia haemat. 91, 172 (1969)
9. Bryan, J.: Vinblastine and microtubules. I. Induction and isolation of crystals from sea urchin oocytes. Exptl. Cell Res. 66, 129 (1971)
10. Cardinali, G., Cardinali, G. and Mehrotra, T. N.: Comparative Studies on the Statmokinetik Effects of Vincristine (VCR), Vinblastine (VLB) and Colchicine. Proc. amer. Ass. Cancer Res. 4, 10 (1963)

11. Cardinali, G. and Cardinali, G.: Experimental Studies on the Combined Use of Vinblastine and Vincristine. *Chemotherapia* 12, 226 (1967)
12. Cardinali, G., Cardinali, G. and Enein, M. A.: Studies on the Antimitotic Activity of Leurocristine (Vincristine). *Blood* 21, 102 (1963)
13. Creasey, W. A.: Modifications in biochemical pathways produced by the Vinca-Alkaloids. *Cancer Chemoth. Rep.* 52, 501 (1968)
14. Creasey, W. A., Markiw, M. E.: Uptake of Vinblastine (VLB) by Ehrlich ascites carcinoma cells in vitro. *Fed. Proc.* 25, 733 (1966)
15. Fusenig, N. E., Obrecht, P.: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide. *Int. Symp. ü. d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin*. S. 148. Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien (1969)
16. Gebhart, E., Schwanitz, G., Hartwich, G.: Zytogenetische Wirkung von Vincristin auf menschliche Leukocyten in vivo und in vitro. *Med. Klin.* 64, 2366 (1969)
17. Mc. Geer, P. L., Mc. Geer, E. G.: Effect of Amethopterin and Vincalukoblastine on urinary 4-amino-5-imidazolecarboxamide. *Biochem. Pharmacol.* 12, 296 (1963)
18. George, P., Journey, L. J., Goldstein, M. N.: Effect of Vincristine on the fine structure of HeLa cells during mitosis. *J. Nat. Cancer Inst.* 35, 355 (1965)
19. Gorman, M., Neuss, N., Svoboda, G. H.: *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 4745 (1959)
20. Hodes, M. E., Rohn, R. J., and Bond, W. H.: Vincalukoblastine. I. Preliminary Clinical Studies, *Cancer Res.* 20, 1041 (1960)
21. Hunter, J. C.: Effects of Vincalukoblastine-sulfate on metabolism of thioguanine resistant L-1210 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 12, 283 (1963)

22. Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H. und Vlantis, J.: Antitumor Principals derived from Vinca. I. Vincaleukoblastine and Leuroesine. *Cancer Res.* 20, 1016 (1960)
23. Krishan, A., Hsu, D.: Binding of Colchicine-³H to Vinblastine-and-Vincristine-induced crystals in mammalian tissue culture cells. *J. Cell Biol.* 48, 407 (1971)
24. Lettré, H.: Action of Vincaleucoblastine upon cells in vitro and against Ehrlich Ascites Tumours. *Excerpta Medica International Congress Series Nr. 106 S. 43 - 49. Proceedings First Symposium European Cancer Chemotherapy Group (G.E.C.A.) Paris June 1965*
25. Lettré, H.: Zellstudien mit Vinca-Alkaloiden in vivo und in vitro: Zit. nach Bock, H. E. *Internationales Symposium ü. d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide (1968). Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien (1969)*
26. Malawista, S. E., Bensch, K. G. Sato, H.: Vinblastine and Griseofulvin reversibly disrupt the living mitotic spindle. *Science* 160, 770 (1968)
27. Marmont, A. M., Damasio, E. E., Rossi, F.: The stathmokinetic effect of the Vinca rosea alkaloids in Hodgkin's disease and in the acute leukemias. In: *Intern. Symposium ü. d. Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin. Frankfurt/M. (1968) Urban & Schwarzenberg (1969) Hrsg. E. Gmachl*
28. Mehrotra, T. N. and Cardinali, G.: Effects of Colchicine and Catharanthus roseus (Vinca rosea) Alkaloids on Mitosis of Syrian Hamster Bone Marrow Cells. *Indian J. Path. Bact.* 8, 98 (1965)

29. Neuss, N., Gorman, M., Boaz, H. E. and Cone, N. J.: Vinca Alkaloids. XI. Structures of Leurocristine (LCR) and Vincalukoblastine (VLB). J. Am. Chem. Soc. 84, 1509 (1962)
30. Neuss, N., Gorman, M., Svoboda, G. H., Maciak, G., Beer, C. T.: Vinca Alkaloids III. Characterization of Leurosine and Vincalukoblastine, New Alkaloids from *Vinca rosea* Linn. J. Amer. Chem. Soc. 81, 4754 (1959)
31. Noble, R. L., Beer, C. T. und Cutts, J. H.: Role of Chance. Observations in Chemotherapy: *Vinn rosea*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 76, 882 (1958)
32. Obrecht, P., Fusenig, N. E.: Die Wirkung von Vincalukoblastin (Velbe) auf die Glykolyse von Tumorzellen. Europ. J. Cancer 2, 109 (1966)
33. Palmer, C. G., Livengood, D., Warren, A. K., Simpson, P. J. and Johnson, I. S.: The Action of Vincalukoblastine on Mitosis in vitro. Exper. Cell. Res. 20, 198 (1960)
34. Pearson, K.: Wissenschaftliche Tabellen, S. 169. Geigy, Basel (1969)
35. Rohr, K.: Das menschliche Knochenmark. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)
36. Siebs, W.: Mitoseablaufstörungen: III. Mitteilung. Zur Wirkung von Vincalukoblastin auf normale und maligne Zellen in vitro. Z. Zellenforschung 61, 231 (1963)
37. Vaiktevicius, V. K., Talley, R. W., Tucker, J. L. and Brennan, M. J.: Cytological and clinical observations during vincalukoblastine therapy of disseminated cancer. Cancer 15, 294 (1962)

38. Valeriote, F. A., Bruce, W. R.: Comparison of the sensitivity of hematopoietic colony forming cells in different proliferative states to Vinblastine. J. Nat. Cancer Inst. 38, 393 (1967)
39. Warnecke, P., Seeber, S.: Angriffspunkte von Vinca-Alkaloiden im Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel leukämischer Rinderlymphocyten in vitro. Z. Krebsforschung 73, 67 (1969)
40. Wilms, K.: Chemie und Wirkungsmechanismus von Vinca-Alkaloiden. Planta Medica 3, 327 (1972)

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. med.
Irene Boll für die Überlassung des Themas und ihre
stetige und großzügige Unterstützung danken.

LEBENS LAUF

Am 24. November 1948 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Edmund Kaut und seiner Ehefrau Charlotte geb. Eske in Neunkirchen/Saar geboren.

1955 wurde ich in die evangelische Volksschule Ottweiler/Saar eingeschult. Von 1959 an besuchte ich das Mädchenrealgymnasium in Neunkirchen/Saar, wo ich im Sommer 1968 die Hochschulreife erwarb.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der FU Berlin. Nach 10-semesterigem Studium bestand ich am 31. 1. 1974 die zahnärztliche Prüfung.

Seit Mai 1974 war ich in verschiedenen Berliner Praxen als Assistenz Zahnärztin tätig.

